

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Linfocitos T cooperadores foliculares circulantes en
trasplante renal**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Francisco Luis Cano Romero

Directoras

Rocío Laguna Goya
Estela Paz Artal

Madrid

© Francisco Luis Cano Romero, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DPTO. INMUNOLOGÍA, OFTALMOLOGÍA
Y OTORRINOLARINGOLOGÍA



**LINFOCITOS T COOPERADORES FOLICULARES
CIRCULANTES EN TRASPLANTE RENAL**

Francisco Luis Cano Romero

MADRID 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

DPTO. INMUNOLOGÍA, OFTALMOLOGÍA Y OTORRINOLARINGOLOGÍA



**LINFOCITOS T COOPERADORES FOLICULARES
CIRCULANTES EN TRASPLANTE RENAL**

Memoria para optar al grado de doctor presentada por

Francisco Luis Cano Romero

Madrid, 2019



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR

D.Francisco Luis Cano Romero con número de DNI 75121370N, estudiante en el Programa de Doctorado de Investigación Biomédica, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, como autor de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

LINFOCITOS T COOPERADORES FOLICULARES CIRCULANTES EN TRASPLANTE RENAL

y dirigida por las doctoras Rocío Laguna Goya y Estela Paz Artal

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 18 de Septiembre

de 2019

Fdo.



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Inmunología, oftalmología y otorrinolaringología

Área de Inmunología

Doctorado en Investigación Biomédica (RD 99/2011)

Título de la Tesis

**LINFOCITOS T COOPERADORES FOLICULARES CIRCULANTES EN
TRASPLANTE RENAL**

Tesis doctoral presentada por Francisco Luis Cano Romero

para optar al grado de Doctor

Dirigida por las doctoras Rocío Laguna Goya y Estela Paz Artal

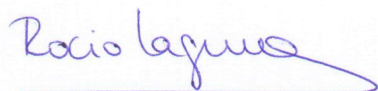
Madrid, 2019

Doña Rocío Laguna Goya y doña Estela Paz Artal, del servicio de Inmunología del Hospital Universitario 12 de Octubre,

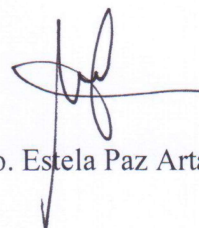
CERTIFICAN

Que el trabajo de Investigación titulado “Linfocitos T cooperadores foliculares circulantes en trasplante renal”, ha sido realizado por Don Francisco Luis Cano Romero, bajo nuestra dirección y asesoramiento, considerando que es apto para su defensa ante tribunal y reúne las condiciones exigibles para optar al grado de Doctor.

Y que así conste, extendemos el presente certificado en Madrid, 2019



Fdo. Rocío Laguna Goya



Fdo. Estela Paz Artal

A María

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a Estela Paz por la oportunidad de realizar la tesis doctoral bajo su dirección. Gracias por ser una directora exigente y justa, y ayudarme con toda tu experiencia investigadora a sacar el mayor partido al periodo de residencia en el 12 de octubre. Gracias por aceptarme en vuestro grupo, sin ser residente vuestro. Han sido unos años de mucho trabajo que dan sus frutos, siempre te estaré agradecido por haber confiado en mí.

El 2 de febrero de 2014 Estela me incluyó en el Proyecto Integrado de Trasplante, junto con una residente de inmunología, que ya era doctora y que contaba con experiencia internacional. Así conocí a Rocío, que ha llegado a ser también la directora de este trabajo. Gracias Rocío por ayudarme y orientarme con toda tu experiencia durante estos cinco años. El grupo de Trasplante tiene asegurado un futuro brillante al tenerte como investigadora senior.

Gracias a todo el servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre, han sido muchas horas las que he compartido con vosotros. En especial quiero dar las gracias a Sergio, Alberto y Lola, los momentos que he disfrutado con vosotros dentro y fuera del hospital no se olvidan.

Gracias igualmente a todo el servicio de Bioquímica Clínica del Hospital 12 de Octubre, gracias a todos por aprender tanto con vosotros. Me gustaría dar un especial agradecimiento a Paloma Puerta por ponerme en contacto con la Fundación Jiménez Díaz y ayudarme a poder dar mis primeros pasos como facultativo. Gracias de igual forma a Pilar Díaz Rubio por presentarme a Ana Díaz del Hospital de la Princesa y poder seguir avanzando profesionalmente. Quiero incluir en mis agradecimientos a todos los residentes de análisis del 12 de octubre, sois un grupo excelente y todos los años se

incorpora gente genial al equipo. El nivel del vídeo de despedida de los R4 se supera cada año, sois los mejores.

De mi etapa actual, estoy agradecido a todo el servicio de Análisis Clínicos del Hospital de la Princesa. Muchas gracias por acogerme y sentirme como en casa entre vosotros, me siento afortunado cada día al ir a trabajar y poder aprender de cada uno de vosotros. Me gustaría agradecer en especial a Natalia haberme acompañado por las tardes en la recta final de la tesis.

Por último, quiero dar el más especial de los agradecimientos a toda mi familia. Gracias a mi hermana Pilar por el diseño de la portada de esta tesis doctoral, sabes que admiro tu trabajo y me siento orgulloso de la hermana que tengo. Gracias a mis padres por habernos inculcado el afán de superación, si hemos llegado donde estamos es por vuestro apoyo. Gracias a mi tío Francisco, siempre presente incluso cuando falta. Gracias a mis abuelos, de origen humilde, ojalá pudieran verme firmando esta tesis doctoral. Para terminar, no se si dar las gracias o pedir perdón a María, mi mujer, por todo el tiempo que le he dedicado a esta tesis y no se lo he dedicado a ella. Gracias por estar siempre a mi lado, hacerme mejor persona y darle sentido a todo. Eres lo mejor del día, cada día.


Guadarrama, 2019

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	8
SUMMARY	15
I. INTRODUCCIÓN	22
1. Trasplante Renal	
1.1. Enfermedad Renal crónica: prevalencia, incidencia e importancia económica.....	23
1.2. Guías KDIGO: Clasificación Enfermedad Renal Crónica (ERC).....	25
1.3. Tratamiento renal sustitutivo.....	27
1.4. Seguimiento clínico de los trasplantados renales.....	29
1.5. Evaluación y diagnóstico del paciente con disfunción del injerto.....	30
2. Inmunología del trasplante	
2.1. Respuesta inmunológica frente al órgano trasplantado.....	32
2.2. Tratamiento inmunosupresor en el trasplante renal.....	37
2.3. Rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante renal y su tratamiento.....	42
3. Linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh)	
3.1. Introducción.....	51
3.2. Origen y desarrollo de las células Tfh.....	52
3.3. Tfh circulantes en sangre periférica (cTfh).....	57

3.4. Diferencias entre las Tfh de los órganos linfoides y las cTfh circulantes.....	58
3.5. Diferentes subgrupos de células cTfh, controversia en el inmunofenotipo.....	59
3.6. cTfh en el trasplante renal.....	61
3.7. Las Tfh como diana de nuevas terapias de inmunosupresión.....	64
II. OBJETIVOS.....	69
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
1. Cohorte de pacientes trasplantados renales.....	72
2. Fenotipado de linfocitos T cooperadores foliculares circulantes	
2.1. Aislamiento de PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells).....	73
2.2. Análisis de cTfh por citometría de flujo.....	74
3. Ensayo funcional <i>in vitro</i> de linfocitos T foliculares cooperadores	
3.1. Cultivo de cTfh y células B de memoria.....	75
3.2. Análisis de plasmablastos por citometría de flujo.....	79
3.3. Medición de Inmunoglobulina G (IgG) en los sobrenadantes de los cocultivos.....	80
4. Detección de IgG en suero.....	81
5. Detección anticuerpos antiHLA.....	82
6. Detección de viremia y serología de CMV.....	83
7. Análisis estadístico.....	84

IV. RESULTADOS	85
1. Características de la cohorte	86
2. Análisis de la relación entre las cTfh preTrasplante (preTx) y características clínicas de los pacientes	
2.1. Demostración de la capacidad funcional de las cTfh en pacientes con ERC	91
2.2. Descripción de cTfh en pacientes preTx y en controles sanos	92
2.3. Efecto de la ERC, enfermedad de base y sexo de los pacientes sobre las cTfh	93
2.4. Efecto de la diálisis sobre los linfocitos cTfh	95
2.5. Exposición a aloantígenos y linfocitos cTfh	97
2.6. Asociación entre cTfh preTx y eventos de naturaleza inmunológica postTx	100
2.7. Análisis de cTfh preTx y el posterior desarrollo de viremia por CMV	103
3. Evolución y significado de las cTfh postTrasplante (postTx)	
3.1. Demostración de la capacidad funcional de los linfocitos cTfh postTx	106
3.2. Evolución de cTfh durante el tiempo postTx	108
3.3. Efecto de la terapia de inducción en las células cTfh	110
3.4. Relación entre los cTfh y el desarrollo de anticuerpos antiHLA postTx	111
3.5. Estudio de las cTfh postTx en función de la serología CMV	112
V. DISCUSIÓN	114
VI. CONCLUSIONES	130

VII. BIBLIOGRAFÍA.....	133
-------------------------------	------------

VIII. ANEXOS.....	158
--------------------------	------------

1. Artículo publicado: Cano-Romero FL, Laguna Goya R, Utrero-Rico A, Gómez-Massa E, Arroyo-Sánchez D, Suárez-Fernández P, et al. Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients. Am J Transplant. 2019;19(1):89–97.

ABREVIATURAS

A

ABMR: Rechazo mediado por anticuerpos.

ABO: Grupos sanguíneos A,B,O.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AECA: Anticuerpos Anti-Células Endoteliales

AntiHLA: Anticuerpos frente a Antígenos Leucocitarios Humanos.

APC: Fluorocromo aloficocianina.

APCH7: Fluorocromo conjugado de APC.

Ascl2: Achaete-scute complex homolog 2.

B

Batf: Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like.

Bcl6: Bcell lymphoma 6.

BD: Becton Dickinson.

BK: Virus poliomavirus B.K.

Blimp1: Proteína que en humanos está codificada por el gen PRDM1.

BPAR: Rechazo agudo probado por biopsia.

BTK: Tirosina quinasa de Bruton.

C

C4d: factor del complemento C4d.

CCR6: Chemokine receptor 6, receptor de quimiocina tipo CC número 6.

CCR7: Chemokine receptor 7.

CD: Cluster of differentiation.

CDC: Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento.

CI: Intervalo de confianza.

CMV: Citomegalovirus.

cTfh: Células T cooperadoras foliculares circulantes.

CTLA4: antígeno 4 del linfocito T citotóxico.

CV: Cardiovascular.

CXCL13: chemokine (C-X-C motif) ligand 13.

CXCR3: C-X-C chemokine receptor type 3.

CXCR5: C-X-C chemokine receptor type 5.

D

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

DM: Diabetes Mellitus.

DSA: Anticuerpos Donante Específicos.

E

EBI-2: Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2.

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay.

ENRICA: Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España.

EPIRCE: Estudio Epidemiológico de la Insuficiencia Renal en España.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERC: Enfermedad Renal Crónica.

F

FACS Buffer: tampón citometría de flujo.

FDA: Agencia de gobierno estadounidense Food and drug administration.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

Foxo1: Forkhead box protein O1.

Foxp3: forkhead box P3.

FSC: Forward Scatter.

G

GC: Centro Germinal.

gp130: Glucoproteína 130.

H

HD: Hemodiálisis.

HLA: Human leukocyte antigen.

HR: Hazard Ratio.

HTA: Hipertensión arterial.

I

ICOS: Inducible T-cell COStimulator, CD278.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleuquina.

IL6R α : Receptor de interleuquina 6.

INF γ : Interferón Gamma.

IRF4: factor 4 regulador del interferón.

ISCIII: Instituto de salud Carlos III.

IVIG: Inmunoglobulina intravenosa.

J

JC: poliomavirus JC.

K

KDIGO: Kidney Disease: Improving Global Outcomes.

L

LEF1: lymphoid enhancer binding factor 1.

M

MFI: Intensidad de fluorescencia media.

MHC: complejo principal de histocompatibilidad.

MICA: Cadena A relacionada con MHC de clase I.

mTor: Mammalian Target of Rapamycin.

N

NFAT: Nuclear factor of activated T-cells

NF-KB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK: células Natural Killer

O

ONT: Organización Nacional de Trasplantes.

OX40: Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, también CD134.

P

PATHI: Programa para Pacientes Hiperinmunizados

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells.

PD1: Programmed cell death protein 1, también CD279.

PE: fluorocromo Ficoeritrina.

PECy7: fluorocromo conjugado de PE con la cianina Cy7.

PerCP-Cy5.5: conjugado de PerCP peridinin-chlorophyll-protein complex con Cy5.5.

PIE: Proyecto Integrado de excelencia.

postTx: postTrasplante.

preTx: preTrasplante.

R

RA: isoforma de CD45 de elevado peso molecular, células T vírgenes.

ROR γ t: RAR-related orphan receptor gamma.

RPMI: medio celular Roswell Park Memorial Institute.

S

SAB: Single antigen bead

SEB: Staphylococcal enterotoxin B from *Staphylococcus aureus*.

SEN: Sociedad Española de Nefrología.

SFI: Intensidad de fluorescencia standard.

SSC: side scatter.

STAT: signal transducer and activator of transcription protein family.

T

T-bet: T-box transcription factor.

TCR: Receptor de la célula T.

TFC1: T-cell factor 1.

Tfh: células T cooperadoras foliculares.

Tfr: T follicular regulatory cells.

TGF β : Transforming growth factor beta.

TOL: Tolerante operacional.

Treg: células T reguladoras.

TRS: Tratamiento renal sustitutivo.

Tx: Trasplante.

U

USRDS: United States Renal Data System.

V

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los linfocitos T cooperadores foliculares (Tfh), están especializados en la cooperación con los linfocitos B para que éstos se diferencien a células plasmáticas, por lo que son necesarios para la producción eficiente de anticuerpos. Los linfocitos T cooperadores foliculares que circulan en sangre periférica (cTfh) son equivalentes a los Tfh, que están localizados en los órganos linfoides secundarios. Se definen como cTfh a los linfocitos CD4+CXCR5+, que a su vez pueden dividirse en subgrupos. Así, se ha relacionado el subgrupo de células cTfh CD4+CXCR5+PD1hiCCR7lo tanto con la producción de anticuerpos protectores frente a infecciones y en respuesta a vacunación; como con la producción de anticuerpos patológicos en enfermedades autoinmunes.

En la última década se ha establecido la importancia de la aloreactividad humoral en la disfunción del riñón trasplantado. Se ha demostrado que la presencia de anticuerpos frente a Antígenos Leucocitarios Humanos (antiHLA) se correlaciona con un peor pronóstico, especialmente si son DSA (anticuerpos donante específicos). El rechazo mediado por anticuerpos es mucho más frecuente en pacientes que tienen DSA preTx que en los que no los presentan. Los pacientes con DSA preTx no sólo tienen unas tasas más elevadas de ABMR, sino también sufren en mayor medida de disfunción crónica del injerto, pérdida del mismo y de una mayor mortalidad.

OBJETIVOS

Dado el papel fundamental de las células Tfh en la respuesta humoral, es posible pensar que en el contexto del trasplante, las células Tfh favorezcan una respuesta mediada por anticuerpos antiHLA y que pudieran estar asociadas con ABMR y pérdida del injerto.

La relación entre las células cTfh y la sensibilización antiHLA todavía no se ha demostrado suficientemente; y no existen muchos datos publicados sobre la posible

asociación entre cTfh y el rechazo del órgano trasplantado. La detección de cambios en los niveles de cTfh antes incluso de la formación de anticuerpos antiHLA y el rechazo podría ser de utilidad como biomarcadores en el trasplante e identificaría a las Tfh como posible diana terapéutica.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se incluyeron todos los trasplantados de riñón entre noviembre de 2014 y junio de 2016 en el hospital 12 de Octubre (n=206). Las cTfh se midieron en el mismo día de extracción de sangre periférica de los pacientes, tomando muestras prospectivamente antes del trasplante, a los 7 y 14 días después del trasplante y a los 1, 3, 6 y 12 meses postTx. Se utilizó el citómetro de flujo BD Canto II y los resultados se analizaron con el software Flow Jo V10. Se definieron las cTfh como CD4+CXCR5+ o CD4+CXCR5+PD1hiCCR7lo.

Las cTfh junto con las células B de memoria del mismo individuo se cocultivaron in vitro para demostrar la capacidad de las cTfh para estimular la conversión a plasmablastos y la producción de anticuerpos. Se utilizó el sorter Influx™ para separar las células. Se cocultivaron las células cTfh y las células B de memoria en una proporción 1:1 durante 7 días en presencia de SEB (Staphylococcal enterotoxin B de *Staphylococcus aureus*). La diferenciación de células B de memoria a plasmablastos (definidos como CD19+CD27hiCD38hi) se midió por citometría y se analizó mediante Flow Jo. Se midieron los niveles de IgG en los sobrenadantes de los cocultivos mediante ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) sandwich.

Los anticuerpos antiHLA se midieron mediante citometría basada en microesferas (Luminex Technology, LABScreen Mixed® kit, One Lambda, CA). La señal fluorescente

se midió usando LAB scan 100 Flow Cytometry y se analizaron mediante el software HLA-Fusion (One Lambda).

RESULTADOS

En la cohorte estudiada la media de edad fue de 56 años, la mayoría hombres, en diálisis que recibieron su primer trasplante de donante en muerte encefálica. Según el riesgo de rechazo, el 40% de los pacientes recibieron como terapia de inducción basiliximab (40%) y el 45% timoglobulina. Tras el trasplante todos los pacientes se trataron con una inmunosupresión de mantenimiento que consistió en la combinación de tacrólimus, micofenolato y glucocorticoide. El 8,7% de los pacientes sufrieron BPAR (rechazo agudo demostrado por biopsia) a lo largo del año de seguimiento tras el trasplante.

La transformación de las células B a plasmablastos en los cocultivos con cTfh fue significativamente más alta en los que tenían células CD4+CXCR5+ que en los cultivos con células CD4+CXCR5-. De forma análoga, la cantidad de IgG medida en los sobrenadantes de los cocultivos con CD4+CXCR5+ fue superior que en los que se añadieron células CD4+CXCR5-. Por tanto, pudimos concluir que las células medidas en sangre periférica con el inmunofenotipo CD4+CXCR5+ representaban a las células Tfh y podían denominarse cTfh.

El porcentaje de cTfh fue significativamente inferior en pacientes con ERC que en controles sanos ($p < 0,01$). En los sujetos con ERC, las cifras más bajas de cTfh se encontraron entre los pacientes en diálisis cuando se comparan con aquellos que todavía no han pasado por ninguna terapia renal sustitutiva ($p < 0,05$). Además, el tiempo en diálisis parece correlacionar con una disminución gradual en el número de cTfh. A pesar de observar menos cTfh en pacientes con ERC, estas células mantuvieron su capacidad de diferenciar a las células B en plasmablastos de manera similar a los controles sanos.

Sin embargo, los plasmablastos de pacientes con ERC produjeron menos IgG que los controles.

Durante el seguimiento postTx, las cTfh aumentaron en el tiempo teniendo en cuenta toda la cohorte. Cuando se analizaron los datos según la terapia de inducción recibida, se observó que el perfil de cTfh postTx en los pacientes tratados con basiliximab fue muy similar a aquellos pacientes sin terapia de inducción. Los números de cTfh 6 meses postTx fueron el doble de los preTx en el grupo de basiliximab ($p<0,05$) y en el de no inducción ($p<0,001$). Por el contrario, en los pacientes tratados con timoglobulina se encontró una reducción drástica en el número de cTfh tras el trasplante inmediato ($p<0,001$). El número de cTfh en los pacientes con timoglobulina también aumentó con el tiempo postTx aunque permaneció más bajo que en los pacientes tratados con basiliximab o sin terapia de inducción. A los 6 meses postTx, las cifras de cTfh en el grupo tratado con timoglobulina fueron similares a los niveles encontrados preTx. Por tanto, se puede concluir que la timoglobulina eliminó drásticamente la población cTfh, teniendo que pasar 6 meses para que el nivel de estas células se recuperara, mientras que el basiliximab no tuvo un efecto de depleción en cTfh.

Por otro lado, se analizó la relación entre las cTfh y la exposición previa a aloantígenos en pacientes en lista de espera de trasplante. En la cohorte estudiada, el 10,2% de los pacientes recibió un segundo trasplante renal. El grupo de pacientes que había recibido un trasplante previo mostró una frecuencia más elevada de cTfh que los pacientes que iban a recibir su primer trasplante ($p<0,05$). Los pacientes que habían tenido transfusiones previas tuvieron unos niveles de cTfh incrementados comparados con los pacientes sin transfusiones previas ($p<0,05$). La exposición a aloantígenos conduce a la producción de anticuerpos antiHLA, por lo que se planteó si, antes del trasplante, las cifras más altas de cTfh podrían estar relacionadas con la sensibilización antiHLA. Se demostró que las

células cTfh estaban incrementadas preTx en las mujeres con antiHLA de clase I comparadas con las mujeres no sensibilizadas ($p<0,05$). Se estudió por separado a las mujeres porque ya se había demostrado que las mujeres tenían menos cTfh que los hombres y que había un porcentaje mayor de sensibilizados frente a HLA en el grupo de las mujeres que de los hombres (51,2 vs. 24,5%). Además, se encontró una correlación positiva entre la frecuencia de cTfh y los niveles de anticuerpos antiHLA de clase I. Estos datos sugieren un papel de las cTfh en la producción de anticuerpos antiHLA en pacientes con contacto previo a aloantígenos antes del trasplante.

También se analizó la relación entre cTfh y la producción de anticuerpos antiHLA de novo postTx. Para ello sólo se consideraron los pacientes que no estaban sensibilizados en el preTx frente a HLA. Estos pacientes no sensibilizados, se estudiaron durante el año de seguimiento en dos grupos, los que desarrollaron anticuerpos antiHLA de novo (-/+,7%) y los que no (-/-,93%). Los pacientes que desarrollaron anticuerpos antiHLA postTx presentaron más cTfh que los que no los desarrollaron ($p<0,05$).

El desarrollo de anticuerpos antiHLA postTx sugiere que las cTfh están activas a pesar de la inmunosupresión de mantenimiento. Para comprobarlo, se midió la capacidad de las cTfh de los pacientes trasplantados de diferenciar células B en plasmablastos in vitro. Las células CD4+CXCR5+ circulantes obtenidas a los 6 meses postTx fueron capaces de hacer que se formaran plasmablastos productores de IgG. Sin embargo, lo hicieron con menor intensidad que las cTfh de controles ($p<0,05$). Esta función reducida de las cTfh en los pacientes trasplantados podría ser debida a la terapia de inmunosupresión de mantenimiento.

Como se encontró que existía una relación entre los niveles altos de cTfh preTx y la sensibilización antiHLA, y ya que los anticuerpos antiHLA favorecen el riesgo de rechazo, se valoró el estudio de la posible asociación entre las cTfh y el rechazo agudo.

En la cohorte estudiada, 18 pacientes (8,7%) desarrollaron BPAR. Los niveles de cTfh preTx se asociaron de manera positiva con el riesgo de BPAR (HR (Hazard Ratio)=1,14 (1,04-1,25), $p<0,01$).

CONCLUSIONES

Se confirmó que las cTfh representan funcionalmente a las Tfh de los órganos linfoides secundarios y pueden ser llamadas Tfh circulantes.

Se observó que el porcentaje de células cTfh fue significativamente menor en pacientes con ERC cuando se compararon con los controles sanos no trasplantados. Se demostró que las células cTfh están aumentadas en pacientes con ERC que habían estado expuestos a aloantígenos, como es el caso de transfusiones de sangre y retrasplante. Además, antes del trasplante los pacientes con anticuerpos antiHLA presentaron más cTfh que los pacientes no sensibilizados.

Después del trasplante, los tratamientos de inducción tuvieron diferentes efectos sobre las células cTfh. Timoglobulina fue muy eficaz eliminando las células cTfh en los primeros meses después del trasplante. Por el contrario, basiliximab no tuvo el mismo efecto. También, después del trasplante se ha demostrado una expansión de cTfh en los pacientes que desarrollaron anticuerpos antiHLA de novo.

El aumento de cTfh antes del trasplante se asoció con un aumento del riesgo de sufrir rechazo agudo del injerto renal durante el primer año después del trasplante.

SUMMARY

INTRODUCTION

Tfh are specialized in providing help to B cells to differentiate into plasma cells and are required for the efficient production of antibodies. cTfh have been described as counterparts of those found in the germinal centres of secondary lymphoid organs. Peripheral CD4+CXCR5+ T cells are considered cTfh, and they can be further divided into subsets. Circulating CD4+CXCR5+PD1hiCCR7lo T cells represented active Tfh differentiation in lymphoid organs and correlated with production of protective antibodies after infection and vaccination, and production of pathogenic antibodies in autoimmune diseases.

Over the last decade, the relevance of humoral alloreactivity in renal graft failure has been established. The presence of antiHLA antibodies has been extensively shown to correlate with worse graft outcome, especially if they are donor specific antibodies (DSA). ABMR is much more frequent in patients with DSA pre-transplantation than without, and it also occurs sooner after transplantation. Patients with DSA not only have increased rates of acute ABMR, but also chronic graft dysfunction, graft loss and death. Pre-existent as well as de novo DSA associate with worse renal graft outcome.

AIM

Given the essential role of Tfh in mounting the humoral response, it is plausible to speculate that, in the context of transplantation, Tfh direct the B-cell dependent alloreactivity for the production of antiHLA antibodies and may be associated with ABMR and graft loss

Still, the relationship between cTfh and antiHLA sensitization has not been sufficiently shown and there is no published data analysing the association between cTfh and acute

graft rejection. The detection of changes in cTfh preceding antiHLA antibody formation and rejection would highlight the potential utility of cTfh as a biomarker in transplantation and it would point out Tfh as a therapeutic target in transplantation.

MATERIALS AND METHODS

We included all renal transplant recipients between November 2014 and June 2016 at Hospital 12 de Octubre (n=206). cTfh were prospectively measured on fresh PBMCs at pre-transplantation and at 7 and 14 days and 1, 3 and 6 months post-transplantation. Cells were acquired using a BD Canto II flow cytometer and results were analysed with Flow Jo V10 software. We defined cTfh as CD4+CXCR5+ or CD4+CXCR5+PD1hiCCR7lo.

cTfh were cocultured with B cells to interrogate their capacity to stimulate conversion to plasmablasts and antibody production. Isolated cTfh and enriched memory B cells were cocultured 1:1 for 7 days, in the presence of the superantigen *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB; 1ug/mL; Sigma-Aldrich). Differentiation of memory B cells into plasmablasts (defined as CD19+CD27hiCD38hi) was measured by flow cytometry and analysed using Flow Jo V10 software. Immunoglobulin G (IgG) was measured in the collected supernatants by a sandwich ELISA.

AntiHLA antibody screening was performed in all patients pre- and post-transplantation in fresh serum samples. AntiHLA antibodies were tested by multiplex microsphere-based flow cytometry (Luminex Technology, LABScreen Mixed® kit, One Lambda, CA).

RESULTS

Median age was 56 and most patients were male, on dialysis and receiving their first transplant from brain death cadaveric donors. Intermediate and high immunological risk patients received induction therapy with basiliximab (40% of recipients) and thymoglobulin (45%), respectively. After transplantation, all patients received

tacrolimus, mycophenolate mofetil and glucocorticoids as immunosuppressive maintenance therapy. Eighteen patients (8.7%) had a BPAR within the one year post-transplantation follow-up.

We first tested whether the peripheral blood CD4+CXCR5+ T cells recorded by us were able to differentiate B cells into immunoglobulin-producing plasmablasts and could then be considered true Tfh representatives. We cocultured CD4+CXCR5+ and CD4+CXCR5- T cells from healthy controls with memory-enriched B cells and quantified the formation of plasmablasts after a week. The transformation of B cells into plasmablasts was significantly higher in cultures with CD4+CXCR5+ than in those with CD4+CXCR5- T cells. Consistently, the amount of IgG was superior in supernatants from B cells and CD4+CXCR5+ T cell cocultures. We can therefore claim that the circulating CD4+CXCR5+ cells measured by us in peripheral blood represent functional Tfh cells, so they can be named as cTfh.

The proportion of cTfh was significantly decreased in ESRD patients when compared to healthy controls ($p<0.01$). Among ESRD subjects, lower cTfh proportion and lower absolute number were observed in patients on dialysis when compared to patients who were not receiving replacement therapy yet ($p<0.05$). Moreover, time in dialysis seemed to correlate with a gradual diminishing of cTfh number. Despite less cTfh were observed in ESRD patients, these cells maintained a capacity to differentiate B cells into plasmablasts similar to controls. However, plasmablasts from ESRD patients produced less IgG than controls.

During the post-transplantation follow-up, cTfh increased in the overall group of patients. When we analysed the cohort according to the induction therapy received, we observed that the profile of cTfh post-transplantation in basiliximab-treated patients was very similar to that of patients without induction therapy. cTfh number at month 6 post-

transplant doubled pre-transplantation cTfh number in both basiliximab-treated ($p<0.05$) and no induction patients ($p<0.001$). On the contrary, in thymoglobulin-treated patients there was a striking reduction in cTfh number early after the administration of the induction therapy ($p<0.001$). cTfh number in thymoglobulin-treated patients also increased over time post-transplant but remained lower than in the basiliximab and no induction groups in every time-point. At month 6, cTfh number in thymoglobulin-treated group was similar to pre-transplantation. Thus, thymoglobulin drastically eliminated cTfh, taking 6 months for these cells to recover, while basiliximab had no depleting effect on cTfh.

cTfh are increased pre-transplantation in recipients with previous exposure to alloantigens and in HLA-sensitized recipients.

We analysed the relationship between cTfh and previous exposure to alloantigens in patients in the waiting list. In our cohort, 10.2% of patients received a second renal allograft. This group of patients who had received a previous renal transplant (and had therefore been exposed to alloantigens from the previous donor) showed a higher pre-transplantation cTfh frequency than the recipients of a first allograft ($p<0.05$). Patients who had had blood transfusions showed increased cTfh compared to non-transfused recipients (1% vs. 0.7%, $p<0.05$). Thus, in our cohort, patients who received transfusions or a previous kidney graft showed augmented cTfh. Exposure to alloantigens drives the production of antiHLA antibodies, so we asked whether, before transplantation, higher numbers of cTfh could be related to antiHLA sensitization. Because women have lower cTfh than men, and there was a higher proportion of women within the sensitized group (51.2% versus 24.5% in the non-sensitized group), we analysed the association between pre-transplant cTfh and antiHLA sensitization separately in men and women. We found higher cTfh numbers in women with antiHLA class I antibodies than in non-sensitized

women, and this difference reached significance when comparing cTfh frequencies between those groups ($p < 0.05$). Moreover, a positive correlation was found between frequencies of cTfh and levels of antiHLA class I antibodies. These data suggest a role of cTfh for the production of antiHLA antibodies in patients with contact to alloantigens before transplantation.

cTfh associate with de novo antiHLA antibody production in renal transplanted patients. We studied cTfh numbers in patients who were not antiHLA sensitized pre-transplantation. Unsensitized recipients were divided depending on whether they developed de novo antiHLA antibodies during the one-year clinical follow-up (-/+ group) (7%) or not (-/- group) (93%). As already noted, cTfh increased with time post-transplant in both groups ($p < 0.001$), however patients who developed de novo antiHLA antibodies showed a significantly higher expansion of cTfh than recipients remaining antiHLA-negative ($p < 0.05$). This result was not due to differences in induction treatment between the groups, because the proportion of patients with no induction, basiliximab or thymoglobulin was similar in -/+ or -/- patients.

The development of de novo antiHLA antibodies post-transplantation suggests cTfh activity despite maintenance immunosuppression. We tested the capacity of cTfh from transplanted patients to differentiate B cells into plasmablast in vitro. Circulating CD4⁺CXCR5⁺ obtained from patients six months after transplantation were able to derive IgG-producing plasmablasts. However, cTfh from kidney recipients differentiated less plasmablasts than cTfh from healthy controls, which resulted in less IgG production ($p < 0.05$). This reduced function of patients cTfh could be due to the immunosuppressive maintenance therapy patients received.

Higher cTfh are associated with acute rejection in renal transplantation. Because we found a relationship between higher cTfh and pre-transplantation or de novo antiHLA

sensitization, and antiHLA antibodies enhance the risk for rejection, we assessed the association between cTfh and acute rejection. In our cohort, 18 patients (8.7%) experienced BPAR. Pre-transplantation count of cTfh was positively associated with BPAR risk (HR=1.14 (1.04-1.25), $p<0.01$).

CONCLUSIONS

Here we analysed the effect of conditions surrounding transplantation on the cTfh subset. We observed that cTfh from ESRD and transplanted patients were capable of transforming B cells into immunoglobulin-producing plasmablasts. cTfh were augmented in recipients with past contact with alloantigens, and a progressive expansion of the cTfh pool was observed after transplantation. The increase of cTfh was significantly noticeable among pre-transplant sensitized patients and in transplanted patients who developed de novo antiHLA antibodies. Finally, we showed that higher pre-transplant cTfh count is a risk factor for acute rejection.

I. INTRODUCCIÓN

1. TRASPLANTE RENAL

1.1. Enfermedad Renal Crónica: prevalencia, incidencia e importancia económica

El trasplante renal es la mejor opción terapéutica para los pacientes que padecen insuficiencia renal crónica, la última etapa de la enfermedad renal crónica (1-3).

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) es un término genérico que define un conjunto de enfermedades heterogéneas que afectan a la estructura y función renal de manera persistente, durante al menos tres meses. La variabilidad de su expresión clínica es debida, al menos en parte, a su etiopatogenia, la estructura del riñón afectada (glomérulo, vasos, túbulos o intersticio renal), su severidad y el grado de progresión.

Las causas más frecuentes de ERC terminal que llevan a la necesidad de Tratamiento Renal Sustitutivo son la nefropatía diabética, la enfermedad vascular arteriosclerótica, nefroangiosclerosis, nefropatía isquémica, la enfermedad glomerular primaria o secundaria a enfermedad sistémica, las nefropatías congénitas y hereditarias y las nefropatías intersticiales.

A nivel mundial, y según los datos del estudio The Global Kidney Health Atlas (4-5), la prevalencia estimada de la ERC por continentes varía del 7% en Asia Meridional al 8% en África hasta el 11% en América del Norte y el 12% en Europa, Oriente Medio, Asia Oriental y América Latina. Entre los países con ingresos económicos altos, Arabia Saudí y Bélgica tienen la prevalencia estimada de ERC más alta (24%), seguidos por Polonia (18%), Alemania (17%), Reino Unido y Singapur (16%). Noruega y los Países Bajos tienen la prevalencia más baja con un 5%. En Estados Unidos, la prevalencia se estima en un 14%, mientras que en Canadá y Australia es del 13%, nivel en el que este informe sitúa a España, ligeramente por encima de la media europea. Los principales factores de

riesgo de poblaciones para desarrollar la ERC a nivel mundial son la Hipertensión Arterial (HTA), Diabetes Mellitus (DM), la Dislipemia, el Tabaquismo y la Obesidad.

En España, el estudio EPIRCE (Estudio Epidemiológico de la Insuficiencia Renal en España) (6) halló en 2010 que la ERC afecta aproximadamente al 10% de la población adulta española. Más recientemente, el análisis de la información recogida en el estudio ENRICA-Renal (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España) (7) de 2018 ha situado la prevalencia de la ERC en el 15,1%, lo que supone 1 de cada 7 adultos en España actualmente.

Por sexo, la prevalencia de la ERC en varones en el estudio ENRICA era del 23,1% frente al 7,3% en mujeres. También varía significativamente por la edad, pues la prevalencia crece hasta más de 30 puntos porcentuales entre sujetos menores de 44 y sujetos de más de 65 (4,8% de prevalencia en el primer grupo y 37% en el segundo).

La prevalencia de la ERC en sus fases más avanzadas y concretamente aquellas que requieren TRS (Tratamiento renal sustitutivo) ha crecido en España en la última década un 23%. Según los datos del Registro S.E.N./ONT (Sociedad Española de Nefrología/ Organización Nacional de Trasplantes), el número de personas en TRS - hemodiálisis, diálisis peritoneal o trasplante ya supera los 1.200 por millón de población, situándose por encima de las 57.000 personas (5).

Con respecto a la incidencia, cada año unas 6.000 personas con insuficiencia renal progresan hasta la necesidad de seguir uno de los tres tipos de tratamiento renal sustitutivo: Hemodiálisis, diálisis preritoneal y trasplante renal. Los datos disponibles sobre nuevos casos se refieren a los pacientes en TRS. El Registro de S.E.N./ONT muestra que, en los últimos diez años, el número de nuevos pacientes que necesitan TRS ha subido un 15%, de 130 personas por millón de población en 2006 a 142 en 2016. En el último año, el incremento fue del 6%.

La enfermedad renal crónica (ERC) se ha convertido en uno de los problemas principales de salud pública en las últimas décadas. La trascendencia epidemiológica de la ERC se basa en dos aspectos fundamentales. Por un lado, el tratamiento sustitutivo de la ERC avanzada mediante diálisis o trasplante renal, aunque afecta únicamente al 1% de los sujetos con ERC, conlleva una marcada reducción de la expectativa de vida y constituye uno de los tratamientos más costosos de las enfermedades crónicas. De hecho, menos del 1% de la población precisa tratamiento renal sustitutivo, pero este consume casi un 5% del presupuesto del Sistema Nacional de Salud. Varios estudios han analizado el coste asociado al tratamiento de la ERC avanzada. El coste medio por paciente en tratamiento sustitutivo renal, en estadio 5D, es seis veces mayor que el tratamiento de pacientes con infección por el HIV y 24 veces mayor que el tratamiento de pacientes con EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) y asma. El coste medio anual por paciente tratado con hemodiálisis es de 46.659,83€ y de 32.432,07€ en diálisis peritoneal. La HD (hemodiálisis) conlleva el mayor impacto económico, superando 3 veces el de Tx (8).

1.2. Guías KDIGO: Clasificación ERC

Las guías KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) (9) publicadas a partir de los resultados de distintos estudios clínicos que incluyen individuos normales, individuos con riesgo de desarrollar ERC y pacientes con ERC, han propuesto una nueva clasificación pronóstica de la ERC basada en una entrada doble por estadios de FG (Filtrado glomerular) (subdividiendo el estadio 3, a su vez, en 3a y 3b, debido al mayor riesgo CV (cardiovascular) y mortalidad del 3b respecto al 3a), y por albuminuria. Esta nueva recomendación sirve para destacar el aspecto multidimensional de la ERC y deja un marco para las recomendaciones sobre la gestión clínica de la ERC.

KDIGO 2012			Albuminuria		
			Categorías, descripción y rangos		
			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Gravemente elevada
Filtrado glomerular			< 30 mg/g ^a	30-300 mg/g ^a	> 300 mg/g ^a
Categorías, descripción y rangos (ml/min/1,73 m ²)					
G1	Normal o elevado	≥ 90			
G2	Ligeramente disminuido	60-89			
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59			
G3b	Moderada a gravemente disminuido	30-44			
G4	Gravemente disminuido	15-29			
G5	Fallo renal	< 15			

Figura 1. Pronóstico de la enfermedad renal crónica según las categorías de filtrado glomerular y de albuminuria. Riesgo de complicaciones específicas de la enfermedad renal, riesgo de progresión y riesgo cardiovascular: verde, riesgo de referencia, no hay enfermedad renal si no existen otros marcadores definitorios; amarillo, riesgo moderado; naranja, riesgo alto; rojo, riesgo muy alto. La albuminuria se expresa como cociente albúmina/creatinina [Tomado de KDIGO, y Gorostidi et al., 2014 (9-10)]

Como se aprecia en la Figura 1, los colores muestran el riesgo relativo ajustado para cinco eventos (mortalidad global, mortalidad cardiovascular, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal) a partir de un metaanálisis de cohortes de la población general. Se trata de una tabla “heat map” donde el riesgo menor corresponde al color verde (categoría riesgo bajo; y si no hay datos de lesión renal, no se puede catalogar siquiera como ERC), seguido del color amarillo (riesgo moderadamente aumentado), naranja (riesgo alto) y rojo (riesgo muy alto), que expresan riesgos crecientes para los eventos mencionados.

1.3. Tratamiento renal sustitutivo

En la fase terminal de la ERC el paciente debe recibir tratamiento inmediato (11). Las opciones son: tratamiento nutricional, tratamiento conservador y tratamiento sustitutivo. El tratamiento nutricional persigue asegurar una ingesta adecuada de alimentos para controlar la acidosis metabólica o las alteraciones hormonales. Por otro lado, el tratamiento conservador pretende enlentecer el deterioro progresivo mediante agentes antihipertensivos, que preservan la función renal. Por último, se encuentra el tratamiento renal sustitutivo: diálisis y/o trasplante renal. Son terapias complementarias, pues la mayoría de los pacientes que reciben un injerto han pasado previamente por un periodo de diálisis (a excepción de los receptores de donantes vivos).

La prediálisis se define como la situación clínica del paciente con insuficiencia renal crónica terminal que aún no ha iniciado el tratamiento sustitutivo. Los tratamientos nutricionales y conservadores durante esta etapa son fundamentales (12).

La diálisis pretende sustituir al riñón no funcionante y prevenir o atenuar los síntomas urémicos derivados de la insuficiente depuración de la sangre. Existen dos modalidades diferentes: la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. La elección de la modalidad de diálisis generalmente depende de factores que no tienen que ver con el trasplante como son la disponibilidad y conveniencia, comorbilidades, factores socioeconómicos y del centro de diálisis.

En la hemodiálisis una máquina conectada a través de un acceso vascular al torrente sanguíneo del paciente filtra los productos de desecho al líquido de diálisis y la sangre se devuelve depurada al individuo.

En la diálisis peritoneal, la sangre se filtra a través de las membranas fisiológicas peritoneales, a las que se accede a través de un catéter. Se infunde una solución en la

cavidad peritoneal y, tras un periodo de intercambio, se procede al drenaje de ese fluido. La diálisis peritoneal potencia la autonomía del paciente y supone un ahorro en infraestructuras. Por lo general, se considera que la forma menos artificial de filtrar los desechos del paciente con insuficiencia renal crónica es la diálisis peritoneal, aunque existe cierta controversia al respecto (13-14).

En la práctica clínica, no se suele recurrir al trasplante hasta que la tasa de filtración glomerular es $<20\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ y que se evidencia un deterioro de la función renal progresiva e irreversible durante los 6-12 meses previos (15). Los pacientes que ya están en diálisis y que son candidatos para trasplante deben ser evaluados lo antes posible para identificar un donante adecuado. Los efectos adversos de la terapia de diálisis son dependientes del tiempo. El análisis de la base de datos USRDS (United States Renal Data Systems) ha mostrado que la duración en diálisis antes del trasplante durante 6 meses o más disminuye la supervivencia del órgano trasplantado, como se observa en la Figura 2 (16-17). Además, el riesgo de mortalidad es también más alto en los pacientes que han sido dializados durante más de 6 meses antes del trasplante. La duración de la diálisis antes del trasplante también puede incrementar el riesgo de cáncer (18).

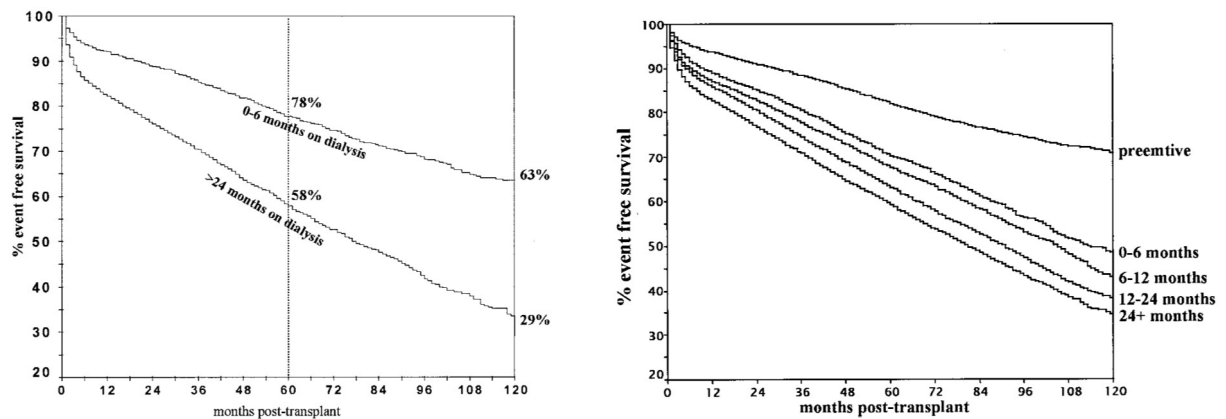


Figura 2. Supervivencia del injerto según tiempo en diálisis. Estudio realizado en 56.587 receptores de riñón de donante por muerte encefálica, en el que se demuestra que el tiempo en diálisis es un factor de riesgo de pérdida del injerto tras el Tx. [Tomado de Meier-Kriesche et al. 2002 (16)]

Los pacientes pueden necesitar de la diálisis después de que su trasplante haya fallado, lo que puede ocurrir años tras el trasplante. Los pacientes que vuelven a diálisis crónica después del trasplante tienen una alta mortalidad comparados con los pacientes con un trasplante funcionando y también comparados con pacientes que no han recibido un trasplante.

1.4. Seguimiento clínico de los trasplantados renales

Los pacientes requieren un seguimiento estrecho tras el trasplante ya que están bajo un régimen inmunosupresor complejo que les hace susceptibles a la infección, enfermedades cardiovasculares y el cáncer (19-20). Además, estos pacientes tienen varias comorbilidades debidas a la enfermedad renal subyacente. Son comunes las infecciones respiratorias y del tracto urinario. Existe más susceptibilidad a infecciones oportunistas como: poliomavirus BK y JC, CMV (Citomegalovirus) y *Pneumocystis jirovecii* (21).

Otra posible complicación de los pacientes trasplantados es la diabetes mellitus, que se puede desarrollar postTx. Los pacientes deben monitorizar su glucemia regularmente (22).

Para evaluar la posible aparición de enfermedades óseas que son comunes tras el trasplante renal, los pacientes deben ser monitorizados regularmente para descartar posibles casos de hiperparatiroidismo y deficiencia de vitamina D.

El desarrollo de cáncer es más común entre pacientes trasplantados en comparación con la población sana. Se debe ser más riguroso en los exámenes de piel de manera periódica siendo revisados por un dermatólogo (23-26).

1.5. Evaluación y diagnóstico del paciente con disfunción del injerto trasplantado

Una de las complicaciones más comunes del trasplante renal es la disfunción del injerto, que puede desencadenar la pérdida del mismo. La rapidez en su reconocimiento y evaluación es vital ya que es reversible. Una pérdida de su función persistente sin ninguna intervención puede dar lugar a la pérdida del órgano trasplantado. No hay consenso en la definición de pérdida de función del injerto pero una posible sería: un aumento de la creatinina sérica de >25% desde su nivel normal de los últimos tres meses, no conseguir una bajada importante tras el trasplante de la creatinina, proteinuria >1g/día (27-29). Algunos pacientes con disfunción del injerto requieren algunas sesiones de hemodiálisis en la primera semana postTx.

El diagnóstico diferencial de la disfunción del injerto renal varía con el tiempo en el que ocurre tras el trasplante. Así, ciertas causas como las complicaciones quirúrgicas son más comunes en el periodo inmediato postTx, mientras que otras causas como las infecciones virales son más comunes en la disfunción crónica tardía. Las principales causas de disfunción inmediata, menos de una semana postTx, son la necrosis tubular aguda postisquémica, el rechazo hiperagudo mediado por anticuerpos, la trombosis vascular, urinomas, hematomas, linfocelos, etc. La disfunción temprana, de una semana a 3 meses postTx, y la tardía, más de 3 meses posTx, son ocasionadas principalmente por el rechazo

agudo (celular o humoral), la nefrotoxicidad de los inhibidores de la calcineurina, la microangiopatía trombótica, la recurrencia de la enfermedad de base, estenosis arterial, infecciones virales, etc.

Para evaluar al paciente con posible disfunción inmediata del injerto se realiza un examen físico e historia clínica para valorar el equilibrio hídrico y la pérdida de sangre. Se somete al paciente a una prueba de imagen para ver si hay alguna obstrucción renal, trombosis vascular o pérdida de orina. En los pacientes que se les han encontrado alguna anomalía, se pueden diagnosticar de trombosis vascular u obstrucción. Se trata con la terapia apropiada y se monitoriza la creatinina sérica y bioquímica de orina. Si la creatinina sérica mejora, se monitoriza al paciente con menos frecuencia y si no, se procede a extraer una biopsia renal y se evalúa según los criterios de Banff (30).

En pacientes sin obstrucción y donde no se evidencia un cambio en los anticuerpos antiHLA, la principal causa de disfunción es la necrosis tubular aguda postisquémica. En estos pacientes se monitoriza la creatinina sérica de manera más estrecha. Si la creatinina no mejora se obtiene una biopsia. Además, si se evidencia aumento de DSA (Anticuerpo donante específico), también se procede a biopsiar para evaluar el posible rechazo mediado por anticuerpos. El desarrollo de novo de anticuerpos frente a los antígenos HLA del injerto es importante en su evolución. Su aparición está asociada a fenómenos de rechazo y a una reducción de la supervivencia del aloinjerto (31). Su aparición puede ocurrir dentro de los 6 primeros meses o hasta varios años después del Tx (32). La presencia de DSA (anticuerpos antiHLA específicos del donante) de novo es un biomarcador con un importante valor predictivo. Es interesante su monitorización ya que su aparición antecede al fallo renal (33). Se recomienda monitorizar los DSA de novo al menos una vez entre los primeros 3-12 meses postrasplante y seguir al menos con determinaciones anuales (34). Si se producen cambios en el tratamiento inmunosupresor, se sospecha de

una mala adherencia al tratamiento o disfunción renal, se justifican monitorizaciones más estrechas.

En la disfunción crónica del injerto hay que descartar nefrotoxicidad por inhibidores de la calcineurina. Las dosis elevadas de tacrolimus o ciclosporina pueden producir elevaciones de la creatinina y se debe ajustar la pauta y medir niveles en sangre en tres días. También se puede medir la viremia de BK y CMV como posible daño al órgano trasplantado.

2. INMUNOLOGIA DEL TRASPLANTE

2.1. Respuesta inmunológica frente al órgano trasplantado

Una limitación importante para el éxito de los trasplantes es la respuesta inmunológica del receptor frente al órgano del donante (35-36).

El sistema inmunológico es un complejo extraordinario que se ha desarrollado en respuesta a la presión evolutiva provocada por la coexistencia de microorganismos a lo largo de millones de años. Este sistema puede dividirse en dos componentes: inmunidad innata y adaptativa (37). A diferencia de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa se encarga del reconocimiento de antígenos específicos y confiere un efecto de especificidad y memoria mediante los linfocitos T y B. Los linfocitos T reconocen los antígenos en la forma de péptidos unidos a las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH), mientras que los linfocitos B tienen receptores de inmunoglobulina que reconocen las porciones antigénicas de las moléculas intactas. Los sistemas inmunes innatos y adaptativos están íntimamente relacionados. La activación antígeno-específica de los linfocitos T da lugar a la producción y secreción de citoquinas y quimoquinas que reclutan componentes del sistema innato y también a mecanismos específicos de producción de anticuerpos y citotoxicidad mediada por células CD8.

La inmunidad innata y la adaptativa no son dos entidades separadas, sino que entre ambas existe una potenciación mutua. Ambos componentes están implicados en toda la alorespuesta. Dentro del componente celular de la inmunidad innata destacan los linfocitos NK y las células dendríticas como las principales células implicadas en la respuesta al trasplante (38). Los linfocitos NK reconocen la expresión de moléculas de estrés celular, aumentando en el daño por isquemia-reperfusión del injerto (39). Las células dendríticas presentan en sus membranas receptores de tipo Toll, que identifican patrones moleculares asociados al daño celular, además las células dendríticas favorecen la respuesta adaptativa al secretar distintos factores que potencian la respuesta inmunológica (40). Dentro del componente soluble de la inmunidad innata en el trasplante destacan las vías alternativa y de las lectinas del complemento (41). La vía clásica del complemento supone el puente entre la inmunidad innata y adaptativa, ya que para activarse necesita la interacción con los anticuerpos producidos por las células plasmáticas. Con respecto a la respuesta inmunitaria adaptativa cabe destacar los estudios de Billingham y Medawar (42) en modelos animales de trasplante de piel que llevaron a la conclusión de que los linfocitos T son los principales efectores del rechazo agudo.

Las principales dianas del sistema inmunológico adaptativo en el trasplante son las moléculas del MHC (complejo principal de histocompatibilidad), (43-44) presentes en la superficie de las células del donante. Una de las principales características de las moléculas HLA es su elevado polimorfismo (existen múltiples alelos de cada gen presentes en la población). Esta impresionante variabilidad HLA, constituye la base molecular del rechazo. Así, el sistema inmunológico del receptor reconoce las diferencias en HLA entre donante y receptor, que desencadena una respuesta aloespecífica, cuyo fin es destruir el injerto (45).

El reconocimiento del antígeno por parte de las células T es un evento clave en la respuesta inmunológica. Este paso clave requiere la interacción del receptor de la célula T (TCR) con el antígeno presentado como un péptido por las células presentadoras de antígeno y una interacción coestimuladora entre ambas células.

El reconocimiento T del aloantígeno ocurre mediante dos posibles mecanismos. La activación directa ocurre cuando células T reconocen moléculas MHC del donante en la superficie de células presentadoras de antígenos del donante. Esta vía es importante durante el rechazo agudo temprano ya que el órgano trasplantado contiene un número importante de leucocitos del donante. Por otra parte, existe otra vía de activación de linfocitos T, donde moléculas MHC del donante pueden ser fagocitadas por células presentadoras de antígeno del receptor, cargadas en moléculas MHC de clase II y exponerse en la superficie de células presentadoras de antígeno del donante, permitiendo la activación indirecta de los linfocitos T del receptor (46).

Clásicamente se han dividido el complejo MHC en dos clases, I y II, que se caracterizan por su estructura, expresión y los compartimentos celulares de los que obtienen los péptidos antigénicos que presentan a las células T. Las moléculas MHC de clase I incluyen las moléculas de antígeno leucocitario humano HLA-A, HLA-B y HLA-C y se encuentran en todos los tipos celulares salvo los eritrocitos. Las moléculas de clase I presentan péptidos citoplasmáticos a células T CD8, que inducen lisis celular. Las moléculas MHC de clase II incluyen moléculas HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Se expresan constitutivamente en células dendríticas, macrófagos y células B. Además, su expresión puede regularse en células epiteliales y en células endoteliales tras la exposición de citoquinas proinflamatorias. Las moléculas de clase II presentan péptidos derivados de proteínas extracelulares a las células T CD4.

La supervivencia de los órganos trasplantados es superior entre parientes con los mismos antígenos HLA y con prueba cruzada negativa comparada con los trasplantes emparejados al azar tratados con la misma inmunosupresión. Entre parientes, en aquellos receptores que compartían un haplotipo HLA con el donante el grado de supervivencia del injerto es intermedia con respecto a los que son HLA idénticos. Aunque la supervivencia de los riñones trasplantados con un HLA totalmente diferente entre donante y receptor es más reducida comparada con un HLA idéntico, la supervivencia sigue siendo mayor que la de los pacientes que están en lista de espera de recibir un donante (47-48). El grado del emparejamiento en HLA se asocia a supervivencia a largo plazo, no a rechazo temprano. La supervivencia a largo plazo es mejor entre pacientes con HLA idéntico, particularmente entre parientes, y peor entre pacientes emparejados al azar y de donante cadáver (49-50).

El desarrollo de anticuerpos antiHLA se produce al haber una exposición de antígenos HLA alogénicos, que pueden darse en 3 situaciones: trasplante, embarazo y transfusiones sanguíneas. Además, se ha descrito que estos anticuerpos también pueden aparecer por sensibilización cruzada durante una infección o por procesos inflamatorios (51). La presencia de anticuerpos anti-HLA DSA, está asociada a eventos de rechazo y a fallo del injerto (52). Estos anticuerpos en postTx tienen un efecto patológico en el riñón trasplantado, en el que provocan una lesión de la vasculatura mediante múltiples mecanismos que incluyen desde la activación de la cascada del complemento a la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o la activación del endotelio vascular (53). La cascada del complemento comienza con la unión de los anticuerpos antiHLA DSA al endotelio vascular del riñón trasplantado. Los complejos antígeno- anticuerpo se unen a la molécula C1q activando la vía clásica del complemento, desencadenando la formación del complejo de ataque a la membrana que forma poros transmembrana, lo que

provoca la lisis celular. Otros componentes del complemento, como C3a y C5a, funcionan como quimioatrayentes para macrófagos y neutrófilos. El C5a es también una potente anafilotoxina y provoca edema. Esta activación del complemento forma un rastro de depósitos de C4d, que se utiliza en el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos, junto con la histología de daño tisular y la presencia del DSA inductor del proceso (54). El C4d es un fragmento del componente C4b que se une al endotelio y se forma en una huella duradera y muy específica de ABMR (54)

No obstante, una parte importante de los rechazos humorales descritos (especialmente los de daño crónico) pueden tener lugar sin evidencia de actividad del complemento. Además, las células NK, a través de su receptor CD16, son capaces de unirse a los anticuerpos unidos sobre las moléculas de HLA del endotelio del injerto (55). Esta unión induce la producción de citocinas proinflamatorias, como el INF- γ y TNF, lo que induce su capacidad citotóxica (56). Por último, los anticuerpos antiHLA DSA también pueden activar directamente el endotelio vascular. Se produce una proliferación de las células endoteliales y el engrosamiento y multilaminación de la membrana basal del glomérulo y los capilares peritubulares (53).

2.2 Tratamiento inmunosupresor en trasplante renal

Se pueden diferenciar cuatro periodos en la evolución histórica del trasplante renal teniendo en cuenta las posibles terapias disponibles. En la primera etapa (1954-1962), el arsenal de tratamientos incluía corticosteroides, 6mercaptopurina y radiación. Las tasas de supervivencia en el primer año postTx estaban por debajo del 50% (57). La segunda etapa, la etapa de la azatioprina (1962-1980) trajo una mejora en la supervivencia en el primer año entorno al 60% (58). La tercera etapa, al principio de los años 80s, es la etapa de la ciclosporina, el primer inhibidor de la calcineurina. Las tasas de rechazo disminuyeron por debajo del 50% y la supervivencia del órgano trasplantado mejoró por encima del 85%. La última etapa empezó a finales de los 90s, con la aprobación de los nuevos fármacos: tacrolimus, micofenólico mofetil, timoglobulina y basiliximab. Las combinaciones de estas terapias ha mejorado las tasas de rechazo (10-15%) y de supervivencia del injerto (95%) en el primer año postTx (58).

El tratamiento inmunosupresor se administra a los receptores del trasplante antes de la cirugía y de manera crónica después de la operación. Su objetivo es reducir la respuesta inmunológica frente al injerto. De esta manera podemos distinguir entre la terapia de inducción y la terapia de mantenimiento.

La terapia de inducción es una terapia intensa de inmunosupresión administrada a la vez que se procede a la cirugía del trasplante renal para reducir el riesgo de rechazo agudo del órgano trasplantado. En la actualidad no está clara qué estrategia es más efectiva o coste efectiva. La estrategia que más se utiliza es la combinación de anticuerpos frente antígenos de las células T (Timoglobulina o Basiliximab), como terapia de inducción, en combinación con dosis bajas de agentes inmunosupresores convencionales (corticoesteroides, tacrolimus y micofenolato), como terapia de mantenimiento (59-60).

Comparado con el tratamiento de mantenimiento con ciclosporina solamente, el tratamiento de inducción con timoglobulina, desarrollado en los años 1980s, se asocia con menos rechazo y menos pérdida del injerto en los primeros 24 meses postTx. Sin embargo, la ventaja en la supervivencia no se observa después de los 5 años a excepción de los pacientes altamente sensibilizados (61). Timoglobulina provoca una depleción de linfocitos T que tarda en recuperarse meses hasta alcanzar niveles previos a la administración del fármaco. Por otro lado, basiliximab (antiCD25), aprobado a finales de los 1990s, también reduce el rechazo agudo cuando se usa junto con ciclosporina (58). Basiliximab previene la proliferación de células T mediada por IL2 y no causa depleción celular como timoglobulina. Cuando se compara timoglobulina con basiliximab se ha demostrado que en pacientes de alto riesgo inmunológico, timoglobulina ha demostrado una reducción en la incidencia de rechazo (62), así como un mejor resultado en un seguimiento en 5 años en los pacientes con timoglobulina (63). A pesar de décadas de experiencia, siguen sin haber un consenso sobre la terapia óptima de inducción. Hacen faltan nuevos ensayos clínicos para definir las pautas de los tratamientos de inducción, entre otros motivos, por ejemplo, porque los estudios publicados se realizaron cuando se empleaba ciclosporina de terapia de mantenimiento y en la actualidad se utiliza mayoritariamente tacrolimus que es más eficaz. Aún así, basiliximab tiene un perfil de tolerabilidad y seguridad percibida comparable a placebo (64) y se ha recomendado para pacientes de menor riesgo inmunológico (11). Como los fármacos que bloquean el receptor de IL2 se asocian con tasas de rechazo más altas (62-63) y con más anticuerpos DSA (65) comparados con timoglobulina en pacientes de alto riesgo, KDIGO recomienda las terapias de depleción en este último grupo de pacientes.

En la Figura 3 se observan algunas de las variables que se tienen en cuenta para la decisión de la terapia de inducción según el riesgo inmunológico del paciente.

No induction < Basiliximab < Alemtuzumab < Anti-thymocyte globulin



Lower risk

Zero HLA mismatch
Live donor
Caucasian ethnicity
Low panel reactive antibody
Absence of donor specific antibody
Blood group compatibility
Immediate graft function
Short cold ischemia time
First transplant

Higher risk

Increased # of HLA mismatches
Younger recipient and older donor age
African-American ethnicity
High panel reactive antibody
Presence of donor specific antibody
Blood group incompatibility
Delayed onset of graft function
Long cold ischemia time
Retransplant

Figura 3. Terapia de inducción según el riesgo inmunológico del paciente. Se enumeran algunas de las variables que se tienen en cuenta para decidir la terapia de inducción.
[Tomado de Hardinger et al. 2013, (59)]

El manejo de la inmunosupresión en los pacientes trasplantados renales no es una práctica sencilla en la que una sola opción valga para todos los enfermos. Hay muchos factores que influyen en la selección de una determinada terapia como se observa en la Tabla 1. El objetivo principal es llegar a un equilibrio entre la prevención del rechazo y el riesgo de inmunodeprimir de más al paciente. En la elección se tienen en cuenta una suma de riesgos médicos e inmunológicos de los pacientes para conseguir la mejor eficacia del tratamiento.

Tabla1. Factores de riesgo preTx para rechazo agudo postTx.

Factores de riesgo preTx para rechazo agudo postTx	Descripción
Edad del receptor	Los pacientes más jóvenes presentan una respuesta inmunológica más fuerte (11), además presentan un mayor riesgo por la falta de adherencia al tratamiento inmunosupresor (66-68).
Edad del donante	Tendencia a más inmunogenicidad en órganos con más años (11).
Raza	Mayor riesgo de rechazo entre las personas de origen africano (69-72).
Transfusiones previas	Se considera como respondedor inmunológico débil si el paciente no se ha sensibilizado a pesar de haberse sometido a transfusiones previas (73-74).
Trasplante previo	La pérdida temprana del primer injerto aumenta el riesgo d rechazo tras el trasplante del siguiente órgano tasplantado(74).
Embarazos previos	Aumento del riesgo con cada embarazo (75-76).
Anticuerpos antiHLA DSA	Su presencia aumenta el riesgo de rechazo (77).
Emparejamiento HLA	Un peor emparejamiento en HLA entre donante y receptor se asocia a mayor tasas de rechazo, particularmente más pronunciados para HLA DR (69,78-83).

Las guías KDIGO estratifican a los pacientes en riesgo inmunológico alto y bajo dependiendo del riesgo de rechazo. Los pacientes de alto riesgo, típicamente sensibilizados para HLA, entre otros factores, reciben una terapia de inmunosupresión más potente que los pacientes de bajo riesgo. Por el contrario, los pacientes de bajo riesgo son más mayores, no sensibilizados o mejor emparejados para HLA, entre otros factores (11). A pesar de que la estratificación del riesgo inmunológico sea generalizada, no existe una estandarización de los factores a tener en cuenta, lo que limita las posibles comparaciones en los estudios de inmunosupresión para establecer regímenes de tratamiento óptimos. En cuanto a los riesgos médicos, la comorbilidad de los pacientes

con ERC, su estado funcional y nutricional puede influir también en la selección de la terapia de inmunosupresión (45).

En el Hospital 12 de Octubre, la administración de terapia de inducción se valora en función del riesgo inmunológico del paciente y del riesgo de isquemia del injerto. Cuando hay mayor riesgo de isquemia, por ejemplo si el injerto procede de un donante en asistolia, se administra tratamiento de inducción para poder reducir la dosis de tacrolimus que es nefrotóxico. En general, reciben tratamiento de inducción con timoglobulina los pacientes con anticuerpos anti-HLA preTx, cuando se realiza un trasplante combinado páncreas-riñón y cuando el riñón proviene de un donante en asistolia. Basiliximab se administra cuando el receptor y/o donante son de edad avanzada, y cuando se trata de un trasplante de donante vivo. Teniendo en cuenta estas pautas generales, y valorando a cada paciente individualmente, se decide la administración del tratamiento de inducción así como el número de dosis a recibir.

La terapia de mantenimiento se caracteriza por ser un tratamiento crónico que se ajusta según la evolución del paciente y es menos agresivo que la terapia de inducción. Se utilizan inhibidores de la calcineurina, como tacrolimus y ciclosporina, o inhibidores de mTOR (mammalian Target of Rapamycin), como sirolimus y everolimus, y antiproliferativos, como el micofenolato de mofetil y azatioprina, combinados o no con corticoesteroides. Para ciertos pacientes se pueden combinar también con rituximab, anticuerpo monoclonal deplecionante de linfocitos B.

Para terminar el capítulo de inmunosupresión cabe destacar un ejemplo de manipulación de la inmunidad adaptativa humoral para permitir el trasplante, que es la referida al sistema antigénico ABO (Grupos sanguíneos A,B,O). Antes era una contraindicación para el trasplante la presencia de incompatibilidades ABO entre el donante y el receptor, debido a la presencia de anticuerpos preformados donante específicos que rápidamente

podían atacar el aloinjerto. Ahora existen tratamientos como la plasmaféresis o la esplenectomía y una inmunosupresión agresiva, que permiten retirar estos anticuerpos nocivos para el órgano trasplantado y hacen posible por tanto el Tx renal entre grupos sanguíneos incompatibles (84-85).

2.3. Rechazo mediado por anticuerpos en el trasplante renal y su tratamiento

La disfunción del injerto puede llegar a ocasionar el fallo y pérdida del mismo. Cuando se realizan biopsias por indicación, al existir disfunción del injerto, en el primer año postTx el diagnóstico más común es rechazo celular o borderline. Sin embargo, en las biopsias realizadas a partir del primer año postTx, el rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) es la causa más común de fallo del injerto tras el trasplante de riñón (86). En el estudio de Sellarés y cols. de 2012 se demuestra que la mayoría de los episodios de fallo del riñón trasplantado mostraron en biopsia características de ABMR y subraya la importancia de la no adherencia al tratamiento, como se observa en la Figura 4.

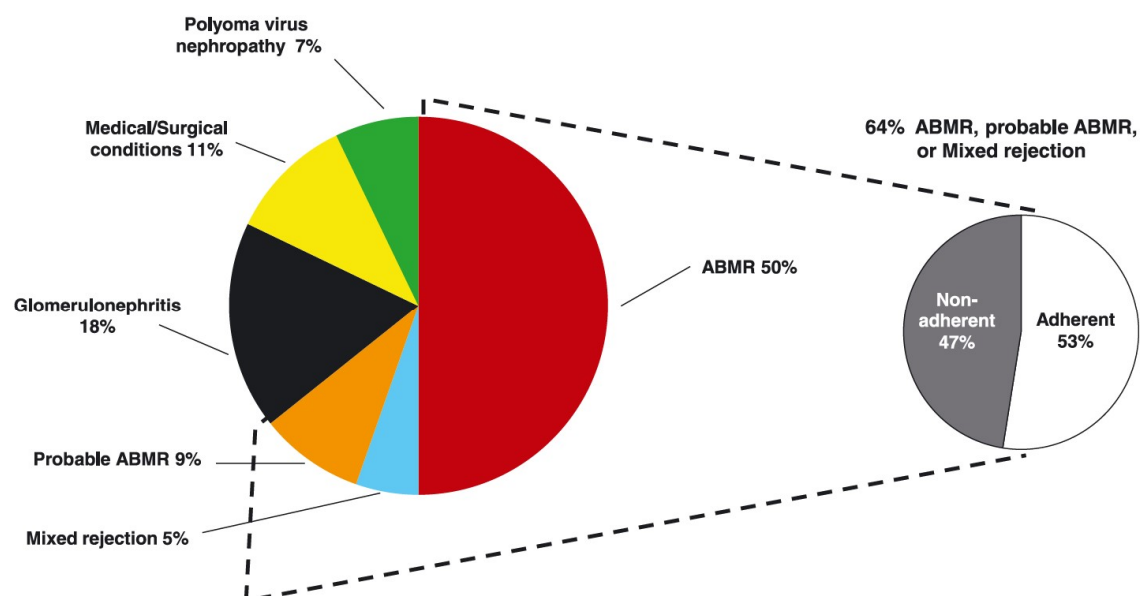


Figura 4. Causas atribuidas a fallo del injerto en pacientes sometidos a biopsia renal. De los 315 pacientes estudiados se realizó biopsia por indicación en 56 casos y 36 (64%) demostraron ABMR. También se observa la importancia de la no adherencia al tratamiento. [Tomado de Sellarés J. et al 2012 (86)]

Las vías celulares y moleculares que regulan el ABMR están todavía investigándose. Sin embargo, existe evidencia que sostiene que la activación de las células B y la producción de células plasmáticas da lugar a la creación de anticuerpos donante específicos, DSA, que reconocen HLA o moléculas no HLA que se expresan en el injerto renal (87). Además de los anticuerpos antiHLA también se ha descrito la importancia en el ABMR de otros anticuerpos como los antiMICA (Cadena A relacionada con MHC de clase I) y AECA (Anticuerpos AntiCélulas Endoteliales) (88-91). En el ABMR agudo, los anticuerpos se unen al endotelio del injerto y activan mecanismos dependientes e independientes del complemento para reclutar células NK, neutrófilos, plaquetas y macrófagos, que contribuyen a la capilaritis peritubular, glomerulitis, necrosis celular, microangiopatía trombótica y una pérdida progresiva de la función del injerto. El ABMR crónico, por el contrario, tiene otra patofisiología diferente que resulta en eventos trombóticos e inflamatorios que desencadenan en daño endotelial y remodelado de la matriz del injerto. El ABMR se observa típicamente en la histología como dilatación capilar y daños en la macrocirculación. En la Figura 5 se aprecian unas imágenes histológicas que muestran la interacción de los anticuerpos con el endotelio vascular, daño tisular agudo y daño tisular crónico. Se muestra la inflamación en los capilares glomerulares y peritubulares con infiltración celular y también la afectación arterial.

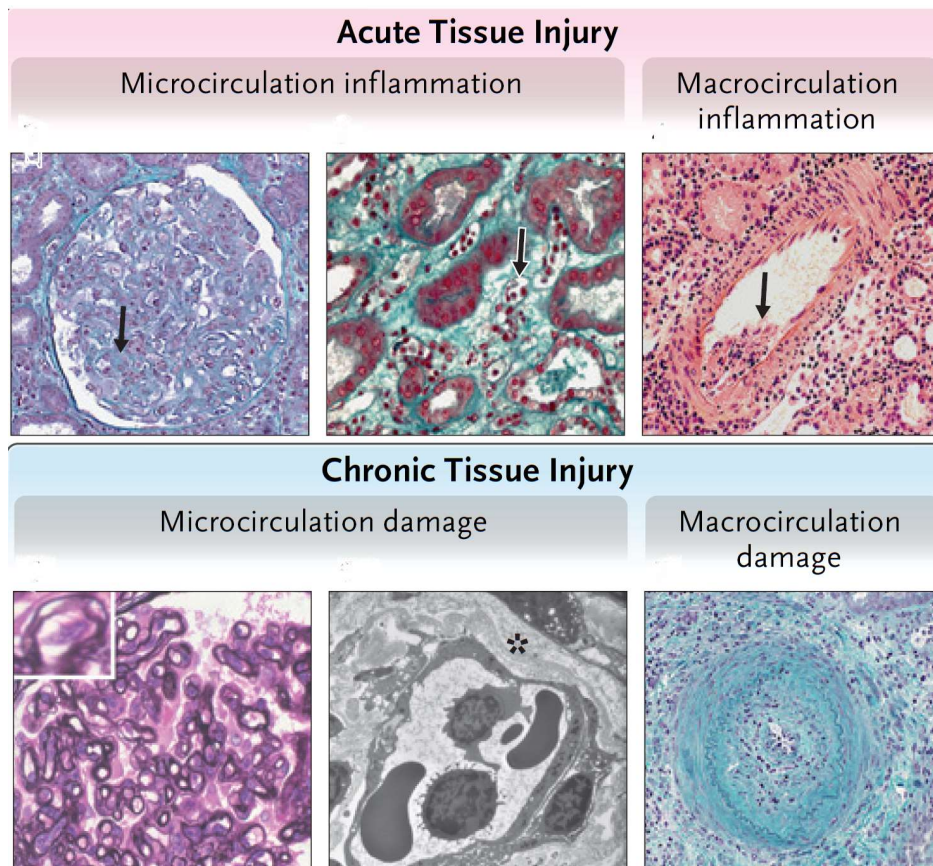


Figura 5. Fenotipos histológicos del rechazo mediado por anticuerpos en riñón. Estas imágenes histológicas muestran la interacción de los anticuerpos con el endotelio vascular, daño tisular agudo y daño tisular crónico. Se muestra la inflamación en los capilares glomerulares y peritubulares con infiltración celular y también la afectación arterial. [Tomado de Loupy A. et al. 2018 (87)]

El ABMR agudo y crónico se asocian con un peor pronóstico tras el trasplante. Los pacientes con ABMR tienen un riesgo mayor de un siguiente episodio de rechazo, ABMR crónico, y pérdida del injerto. De manera similar, el desarrollo de ABMR crónico conlleva un mayor riesgo de muerte para el paciente. Sin embargo, no todos los ABMR desembocan en una pérdida del injerto, y muchos permanecen estables durante años tras el tratamiento de un episodio inicial de rechazo. Los factores de riesgo para la pérdida del injerto en pacientes con ABMR serían sobre todo las características histológicas. Existe también una asociación independiente entre el daño de la microvasculatura y la tinción

C4d (factor del complemento C4d) con peores pronósticos. La presencia de anticuerpos DSA se asocian con peores resultados.

Aunque se conoce desde los 1960s (92) que los anticuerpos tienen un papel fundamental en el rechazo hiperagudo, su significado en otras formas de rechazo se ha demostrado gracias a los avances de técnicas más sensibles que el CDC (ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento) como ELISA, la citometría de flujo y los ensayos de cuantificación multiplex como Luminex ®. El CDC utilizado en las pruebas cruzadas sigue siendo a día de hoy necesario antes del trasplante (93-94) para prevenir el rechazo hiperagudo, sin embargo, tiene como limitación principal que no detecta anticuerpos a baja concentración, resultando en falsos negativos, y también presenta falsos positivos debido a la detección de autoanticuerpos. En 1969, Patel y Terasaki describieron la fuerte asociación entre fallo renal temprano y un resultado positivo de esta prueba (94). La última incorporación al laboratorio de histocompatibilidad ha sido la tecnología Luminex, capaz de detectar anticuerpos antiHLA. El mayor avance de esta tecnología ha sido su capacidad de detectar anticuerpos antígeno-específicos para diferentes HLA (93). A partir del año 2003, la tecnología Luminex revolucionó el área de histocompatibilidad, y actualmente es el método de referencia por su reproducibilidad y sensibilidad (95). Esta tecnología hace uso de moléculas HLA purificadas a partir de líneas celulares linfoblásticas y unidas en la superficie de microesferas de poliestireno, que tienen una mezcla determinada de fluorocromos. Cada microesfera está cargada con un conjunto de antígenos HLA (lo que permite analizar la presencia o ausencia de anticuerpos frente a moléculas de clase I y/o II) o bien con una única especificidad HLA (single antigen bead, SAB), lo que permite definir las especificidades antigénicas de los anticuerpos presentes en el suero del paciente. Véase material y métodos figura 19 (45).

En la prevención de ABMR se miden anticuerpos antiHLA antes del trasplante y su posible aparición postTx. Los pacientes con anticuerpos preexistentes antes del trasplante tienen mayor riesgo de ABMR y de pérdida del injerto comparados con los pacientes no sensibilizados.

En la actualidad existe la posibilidad de desensibilizar a los pacientes para reducir la cantidad de anticuerpos antiHLA (96) y además hay programas para optimizar el emparejamiento en pacientes con DSA preexistentes antes del trasplante, como el programa de donación cruzada o el programa PATHI (Programa de acceso al trasplante de pacientes hiperinmunizados) para pacientes hiperinmunizados en nuestro país.

A partir del desarrollo de los ensayos en fase sólida junto con las nuevas técnicas de genotipificación HLA, se ha extendido el uso de la prueba cruzada virtual, con objeto de predecir el resultado de una prueba cruzada real y así optimizar la selección de sujetos candidatos a Tx. Mediante una aplicación informática, esta prueba se considera positiva cuando, al cruzar los datos del HLA del donante y el panel de anticuerpos anti-HLA del receptor (por SAB), se demuestra la presencia de anticuerpos antiHLA DSA. Esta prueba es una herramienta que predice ABMR y fallo temprano (97), y se utiliza para mejorar el intercambio de órganos, sobre todo en pacientes hiperinmunizados (Programa PATHI) (98-99); Aunque hay evidencias de que la presencia de anticuerpos detectados por Luminex incrementa el riesgo de AMR (100), todavía no existe un consenso unánime sobre el tema.

Se ha tratado de definir el riesgo inmunológico de un anticuerpo medido por Luminex. Mediante SAB se cuantifica el anticuerpo mediante su valor de MFI, mean fluorescence intensity, y se asume que dicho valor es una medida de su concentración. Solamente los anticuerpos anti-HLA cuyo valor de MFI supere un umbral se consideran de alto riesgo. Algunos estudios han demostrado una relación causal entre el valor MFI y la incidencia

de ABMR y fallo prematuro del injerto (101). No obstante, la media de MFI es una medida semicuantitativa.

Las subclases de inmunoglobulina de los DSA podrían también predecir el resultado del trasplante (102). Los pacientes con DSA detectados en el primer año postTx de tipo IgG4 de manera predominante se asocia con daño del injerto tardío, sin embargo, si se presentan de manera predominante IgG3, se asocia con un tiempo de rechazo más corto, daño de la microvasculatura elevado, depósito capilar de C4d y disfunción renal.

Los objetivos de los diferentes abordajes terapéuticos en el rechazo mediado por anticuerpos (Figura 6) son retirar los anticuerpos antiHLA, bloquear sus efectos y reducir su producción. Aunque todavía no hay terapias que hayan recibido la aprobación FDA (Agencia de gobierno estadounidense Food and Drug Administration) para el tratamiento de ABMR, las opciones actuales son la plasmaféresis, IVIG (inmunoglobulina intravenosa), y glucocorticoides. Esta estrategia se podría considerar la referencia para el tratamiento de pacientes con lesiones humorales activas, aunque la evidencia de la eficacia de estos tratamientos no es muy alta. Existen estudios que muestran una mejora utilizando estos tratamientos en el corto plazo (103-106). Sin embargo los resultados a largo plazo siguen siendo malos, lo que pone de manifiesto que hacen falta nuevos fármacos. El papel potencial del anticuerpo monoclonal anti CD20, rituximab, y el inhibidor de proteosoma, bortezomib, en bajar la producción de anticuerpos antiHLA DSA (teniendo como diana las células B y las células plasmáticas, respectivamente) y mejorar la supervivencia del injerto en pacientes con ABMR se ha evaluado recientemente en dos ensayos clínicos, RITUX ERAH (107) y BORTEJECT (108), pero ninguno de estos ensayos clínicos ha demostrado beneficios para los pacientes.

Existe un interés creciente en el uso potencial del eculizumab, anticuerpo monoclonal antiC5, actuando sobre el sistema del complemento para prevenir y tratar el ABMR. Se

ha publicado que este anticuerpo monoclonal disminuye la incidencia de ABMR temprano en pacientes sensibilizados para HLA antes del Tx (109), sin embargo, en pacientes con niveles altos persistentes de anticuerpos antiHLA DSA, el eculizumab falló en la prevención del rechazo crónico mediado por anticuerpos (110).

La inhibición de la IL6 (Interleuquina 6) con el uso del tocilizumab, anticuerpo monoclonal dirigido frente al receptor del IL6, podría tener buenos resultados en el rechazo ya que se ha demostrado una mejora en la supervivencia del injero y estabilización de la función renal sin observarse efectos adversos graves (111).

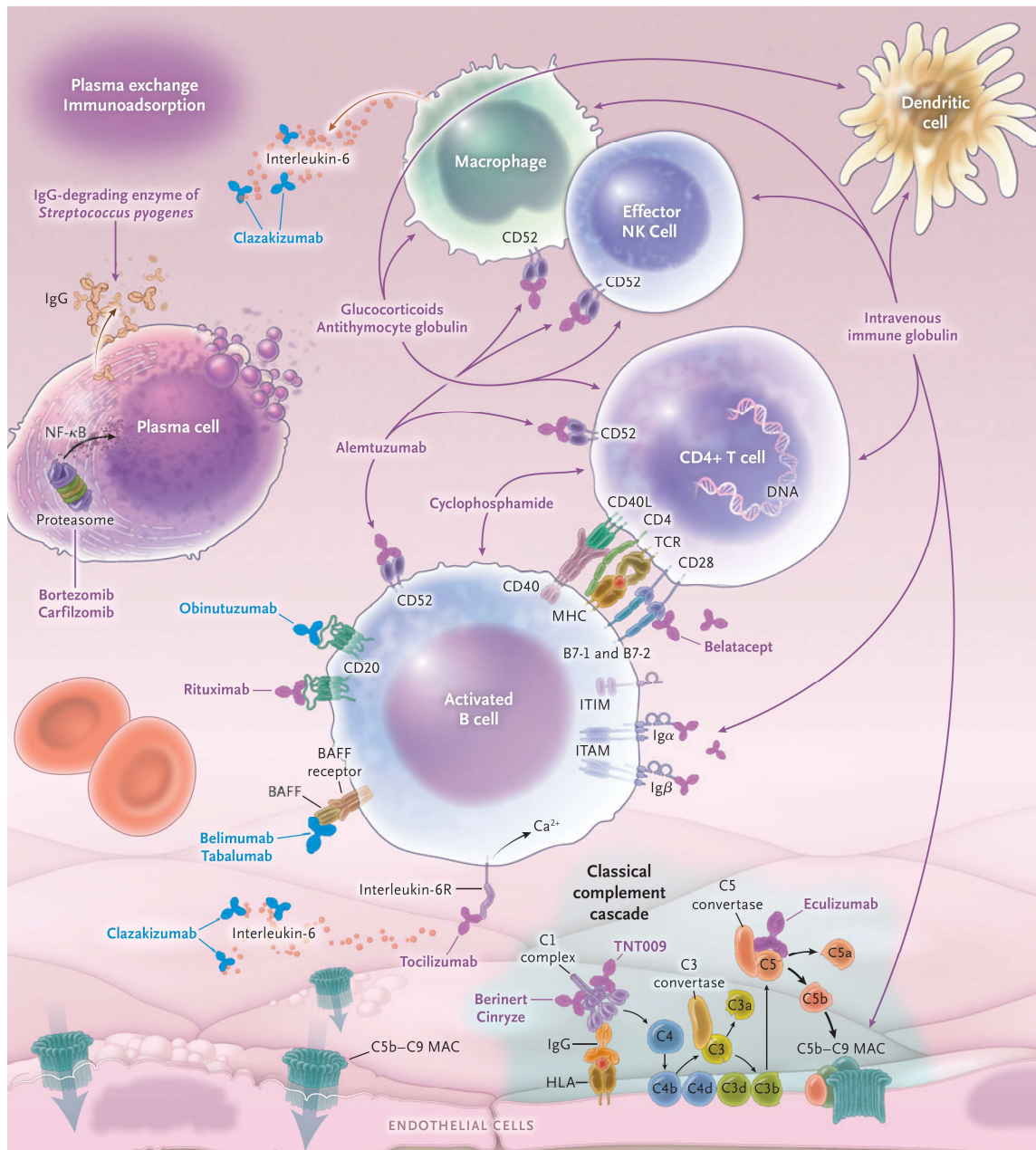


Figura 6. Tratamientos disponibles para el rechazo mediado por anticuerpos. Los diferentes abordajes terapéuticos en el rechazo mediado por anticuerpos son retirar los anticuerpos antiHLA, bloquear sus efectos y reducir su producción. [Tomado de Loupy A. et al. 2018 (87)]

El tratamiento para ABMR sigue estando limitado a las formas agudas de ABMR (112). El rechazo aparece en la mayoría de los pacientes que desarrollan anticuerpos antiHLA patogénicos (86). Aunque se administren los tratamientos para ABMR en estadios tempranos de la enfermedad no son totalmente efectivos. La mejor estrategia para

minimizar el riesgo de la producción de anticuerpos antiHLA sigue siendo mejorar el emparejamiento HLA entre donante y receptor (49). Por tanto, existe la necesidad de conocer los mecanismos que llevan al ABMR para poder diseñar nuevas terapias que interfieran con los procesos que culminan en un ABMR.

En la actualidad no existe ninguna herramienta específica para la valoración temprana de la respuesta de las terapias para la ABMR en trasplantados renales. Recientemente se ha propuesto una escala pronóstica dinámica para predecir la supervivencia del injerto en pacientes diagnosticados de ABMR (113). Este score se basa en la presencia de fibrosis intersticial/atrofia tubular en el diagnóstico de ABMR y cambios en la tasa de filtración glomerular, criterios de Banff de capilaritis peritubular e intensidad de fluorescencia media de los DSA tras el tratamiento. En este artículo los pacientes con ABMR fueron tratados con 5 sesiones de plasmaféresis, 3 dosis de inmunoglobulina humana intravenosa, metilprednisolona y una dosis a la semana durante un mes de rituximab.

3. Tfh: LINFOCITOS T COOPERADORES FOLICULARES

3.1. Introducción

Uno de los descubrimientos cruciales en la inmunología moderna fue demostrar que las respuestas mediadas por anticuerpos requieren la ayuda de células procedentes del timo (114). Ni las células procedentes de la médula ósea ni los timocitos por separado son suficientes para producir anticuerpos, pero sí de manera conjunta. Estas células que interactuaban en estos experimentos clásicos llegarían a ser conocidas como células B y T. Debido a que las células de la médula ósea (Bone marrow, células B) se identificaron como las productoras de anticuerpos, la respuesta se definió como T-dependiente y las células derivadas del timo fueron denominadas células T cooperadoras (115-116). La generación de anticuerpos ocurre en los centros germinales (GC) que son estructuras que se desarrollan en los folículos de células B de los órganos linfoides secundarios. En ellos también se produce la maduración de afinidad de los anticuerpos teniendo lugar procesos como la hipermutación somática, el cambio de clase y la selección de células B de alta afinidad. La identificación de las verdaderas células T CD4⁺ cooperadoras ocurrió gracias al descubrimiento de CXCR5 (114, 117-118), un receptor de quimioquinas que se expresa por las células B maduras y por un subgrupo de células T en tejidos linfoides. CXCR5 es el responsable del posicionamiento de las células B y T en los folículos de los órganos linfoides secundarios gracias al reconocimiento de su ligando CXCL13 (chemokine (C-X-C motif) ligand 13) producido por las células del estroma folicular y que organizan la microarquitectura de los órganos linfoides secundarios (Figura 7). La cooperación T a las células B es esencial para la generación de la respuesta inmunológica. Las células T naïve expresan CCR7 (chemokine receptor 7), y migran a las zonas ricas de linfocitos T de los órganos linfoides secundarios, donde pueden ser estimuladas por las células dendríticas presentadoras de antígenos. Con la activación de estas células T se produce una bajada de

expresión de CCR7 y del ligando-1 de la glucoproteína P-selectina y un aumento de CXCR5, lo que permite la migración a la zona rica en linfocitos B e interactuar con los linfocitos B que hayan reconocido proteínas antigénicas (119).

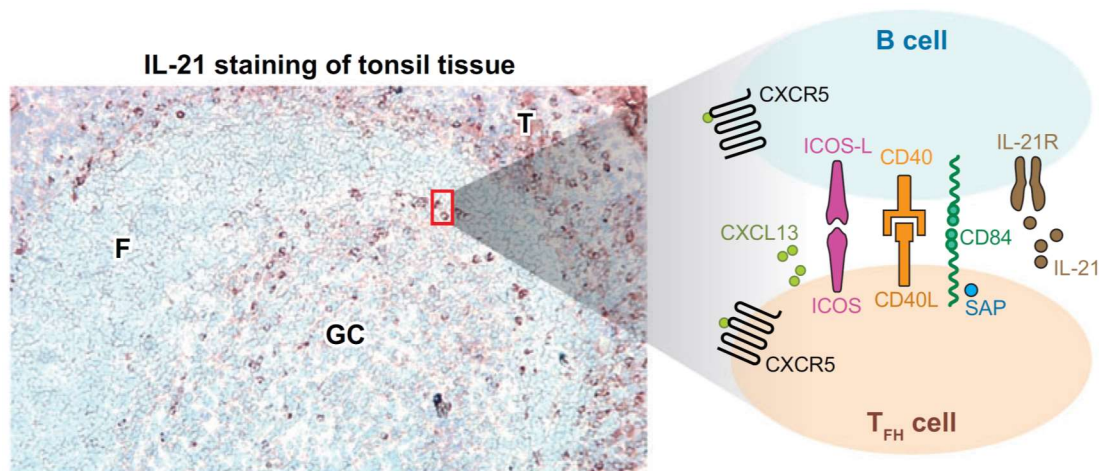


Figura 7. Amígdala humana teñida para la expresión de IL21. T: zona de linfocitos T, F: folículo de células B, GC: centro germinal. Se observa expresión de IL21 en el anillo del centro germinal y en la zona de linfocitos T. Las T_{fh} expresan grandes cantidades de IL21. De forma ampliada se representa la interacción entre la T_{fh} y la célula B, que esta mediada, entre otras moléculas, por ICOS, CD40L y SAP en la superficie de la T_{fh} e IL21 es secretada. [Tomado de King C. et al. 2008 (114)].

3.2. Origen y desarrollo de las células T_{fh}

Las células T_{fh} tienen un papel fundamental en las reacciones que ocurren en los centros germinales dando soporte a las células B. La generación de anticuerpos de protección contra varias infecciones es un aspecto importante de las respuestas inmunológicas mediadas por T_{fh} y la mala regulación de estas células ha sido implicada en varias enfermedades autoinmunes, inflamatorias y oncológicas. Por tanto, su diferenciación y mantenimiento debe estar debidamente regulado para asegurar el soporte correcto a las células B.

La diferenciación de las células Tfh comienza cuando las células T CD4⁺ naïve son estimuladas por las células dendríticas en la zona de linfocitos T de los órganos linfoides secundarios, continua con el primer contacto con las células B en la zona de interacción T-B y termina dentro de los folículos. En cada una de estas etapas el desarrollo de las células Tfh está influenciado por la señalización intracelular que estimulan los receptores de superficie, moléculas coestimuladoras y receptores de citoquinas que desencadenan la activación de una maquinaria transcripcional específica (120).

El primer paso en el desarrollo de las Tfh ocurre cuando las células T naïve CD4⁺ interaccionan con el complejo MHC/antígeno en las células dendríticas que desencadena la generación de células pre-Tfh CXCR5⁺Bcl6^{lo} con una actividad aumentada de factores de transcripción como Ascl2 (Achaete-scute complex homolog 2), transductores de señales y activadores de transcripción como STAT1, STAT3 (signal transducer and activator of transcription protein family), IRF4 (factor 4 regulador del interferón) y Batf (Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like). El segundo paso consistiría en que la expresión de Ascl2 en células T activadas las hace migrar hacia los folículos favoreciendo la expresión de CXCR5 y reprime la expresión de IL-2R-Blimp1. El tercer paso consiste en la primera interacción con células B donde las células CXCR5⁺ empiezan a expresar Bcl6 (B cell lymphoma 6), que en cooperación con otros factores de transcripción termina con la diferenciación final de las Tfh en los centros germinales, siendo el cuarto paso en la ontogenia de las Tfh (121) (Figura 8).

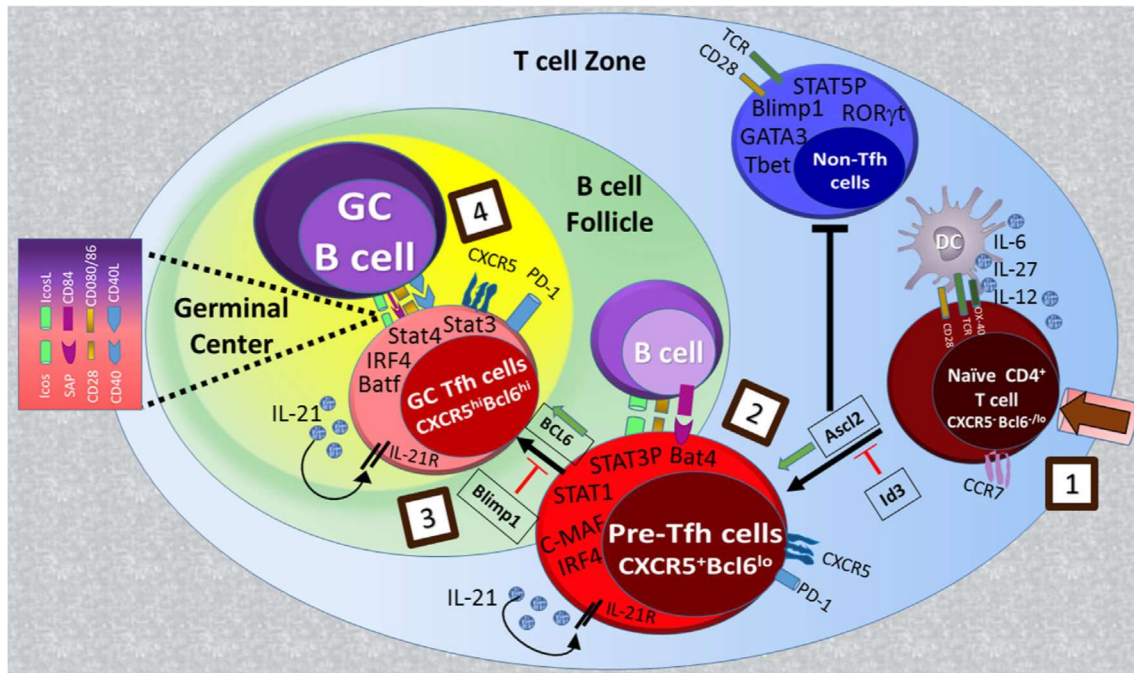


Figura 8. Señalización de regulación para el desarrollo de los linfocitos Tfh. El primer paso ocurre cuando las células T naïve CD4⁺ interactúan con el complejo MHC/antígeno en las células dendríticas que desencadena la generación de células pre-Tfh CXCR5⁺Bcl6^{lo}. El segundo paso consistiría en que la expresión de Acl2 en células T activadas las hace migrar hacia los folículos favoreciendo la expresión de CXCR5 y reprime la expresión de IL-2R-Blimp1. El tercer paso consiste en la primera interacción con células B donde las células CXCR5⁺ empiezan a expresar Bcl6. Termina con la diferenciación final de las Tfh en los centros germinales, siendo el cuarto paso en la ontogenia de las Tfh. [Tomado de Qin L. et al. 2018 (120)]

Recientemente, se ha demostrado que las células Tfh expresan los factores de transcripción LEF1 (lymphoid enhancer binding factor 1) y TFC1 (T-cell factor 1) y que ambos están relacionados en la regulación de Bcl6 (122). Estos factores de transcripción promueven la diferenciación temprana de Tfh manteniendo la expresión de IL6Rα y gp130 (Glucoproteína 130), y favoreciendo la expresión de ICOS (Inducible T-cell COStimulator, CD278) y Bcl6 que es también conocido como el factor por antonomasia de las Tfh y reprime la transcripción entre otros de Blimp-1, T-bet (T-box transcription factor) y RORγt (RAR-related orphan receptor gamma).

La actividad coordinada de citoquinas desencadena los programas de transcripción específicos que estimulan la expresión de moléculas responsables para la función efectora de las Tfh (123) (Figura 9). La diferenciación de las células T CD4⁺ naïve humanas en los órganos linfoides secundarios hacia el fenotipo Tfh es mediado al principio por la señalización de IL12, IL6 y TGFβ (Transforming growth factor beta). La activina A, en combinación con IL12, media un cambio temprano hacia el fenotipo Tfh, incluyendo la expresión de IL21(124-125). La producción de IL12 está incrementada en las células dendríticas en la zona rica en células T. El factor TGFβ es otra citoquina relacionada en la diferenciación Tfh humanas que después de unirse a su receptor, fosforila los factores de transcripción STAT3 y STAT4, pasos clave en el proceso de diferenciación Tfh. Además de IL12, TGFβ e IL6 contribuyen a la diferenciación de células Tfh. La formación de centros germinales y la diferenciación de células B en plasmablastos productores de inmunoglobulinas son dependientes de la producción de IL21 por parte de las Tfh (126-128).

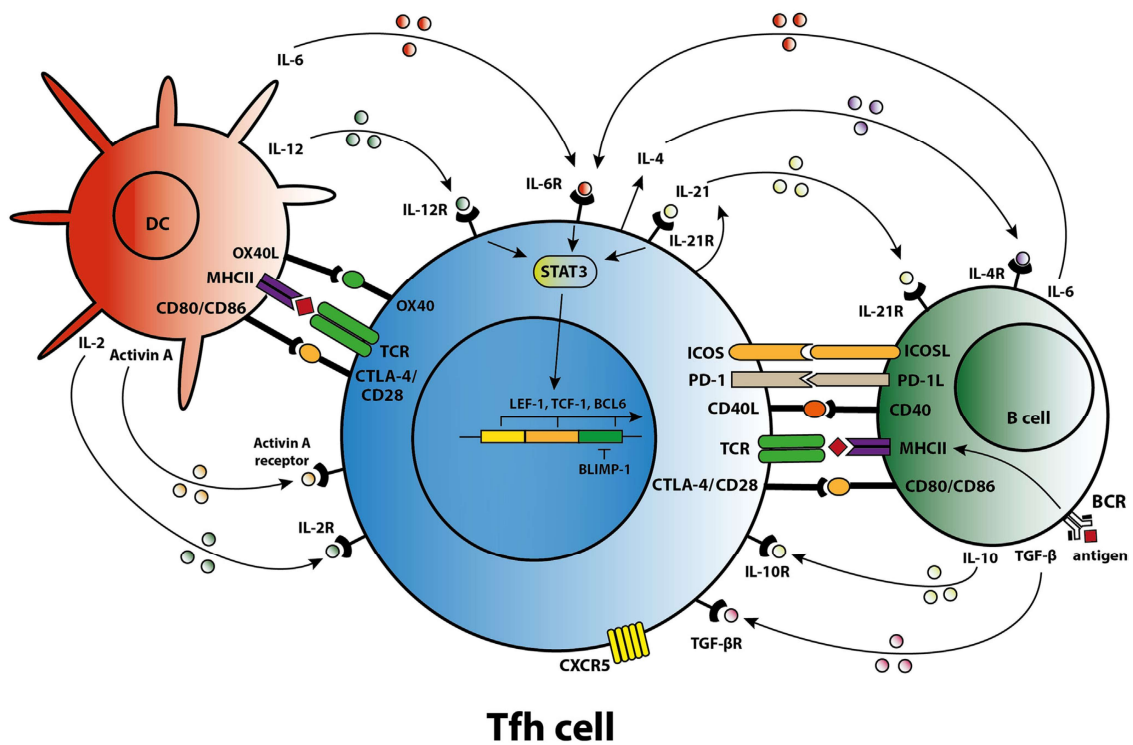


Figura 9. Esquema de las moléculas implicadas en la activación de las Tfh y la interrelación con las células B y células dendríticas. La actividad coordinada de citoquinas desencadena los programas de transcripción específicos que estimulan la expresión de moléculas responsables para la función efectora de las Tfh. [Tomado de Yan L. et al. 2017 (123)]

La pérdida de Bcl6 inhibe selectivamente la diferenciación Tfh con poco efecto sobre otros linfocitos T helper, mientras que la sobreexpresión de Bcl6 induce algunas características de la diferenciación Tfh. Bcl6 controla la expresión de moléculas esenciales para el desarrollo de las Tfh, particularmente aquellas esenciales para el posicionamiento correcto en la frontera T-B y su migración a los folículos, incluyendo la regulación negativa de CCR7, EBI-2 (Epstein-Barr virus-induced G-protein coupled receptor 2), IL-7R, el receptor de la esfingosina 1 fosfato y la regulación positiva de ICOS y PD1. Más tarde en el proceso de diferenciación la coestimulación ICOS y sus señales, mantienen el fenotipo Tfh y controlan la localización de las Tfh en los folículos B regulando el factor

de transcripción Kruppel-like factor2 vía Foxo1 (Forkhead box protein O1). Además, el receptor 2 de esfingosina-1 fosfato se expresa en las Tfh de los centros germinales.

La relación entre Tfh y células B no es unidireccional sino que las células B también mantienen la población Tfh mediante ICOSL y otras moléculas. La expresión de PD1 por las Tfh contribuye a facilitar la maduración de la afinidad, limitando el crecimiento (123).

Además, recientemente se ha evidenciado que un subgrupo de células T reguladoras, denominadas Tfr (T follicular regulatory cells) (129-131), expresan Foxp3 (forkhead box P3), Bcl6 y CXCR5 y tienen la capacidad para regular la reacción controlada por las células Tfh en los centros germinales. La función de las Tfh depende del equilibrio entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias. Sin embargo, los mecanismos inmunoreguladores por los que las células Tfr son controladas se desconoce. En pacientes trasplantados renales que reciben rituximab, antiCD20, como terapia de inducción, ambas células, Tfh y Tfr permanecen en los ganglios linfáticos a pesar de los cambios producidos en los centros germinales y la eliminación de las células B, evidenciándose un mecanismo de acción independiente. El papel de las Tfr en prevenir el rechazo de los órganos trasplantados se desconoce. Recientemente, se ha demostrado que en sangre periférica de pacientes trasplantados renales con ABMR había menos porcentaje de Tfr comparados con aquellos sin ABMR, mientras que el porcentaje de Tfh2 y Tfh17 estaba aumentado, sugiriendo que el incremento en la actividad de las Tfh contribuiría a la ABMR (132).

3.3. Tfh circulantes en sangre periférica (cTfh)

Las células T foliculares están por definición mejor estudiadas en los órganos linfoides secundarios. Nuestro conocimiento del origen y funciones de las células T CD4+CXCR5+ en sangre periférica ha cambiado drásticamente en los últimos años. Actualmente se considera que estas células representan un compartimento de memoria circulante del linaje de células Tfh. Estudios recientes han mostrado que las células Tfh

circulantes de memoria están compuesta de unos subgrupos fenotípicamente y funcionalmente diferentes (133).

La presencia de células T CD4⁺ que expresen CXCR5⁺ en sangre humana fue descrito por primera vez en 1994 (118). Se ha detectado la presencia de células específicas de memoria CD4⁺CXCR5⁺ circulantes incluso hasta 2-4 años tras la vacunación frente a la vacuna del tétanos. También se han detectado células de memoria CXCR5⁺CD4⁺ específicas para la viruela en sangre periférica a pesar que la vacunación se interrumpió durante los años 70 y fue erradicada en 1980, lo que sugiere que se puede mantener una población de memoria específica dentro de la población CXCR5⁺CD4⁺ durante décadas sin reestimulación (134).

La expresión CXCR5 por las células sanguíneas CXCR5⁺CD4⁺ se ha demostrado estable in vitro durante varias semanas sin estimulación. Además, una gran mayoría de células CXCR5⁺CD4⁺ no expresan marcadores de activación. Estas observaciones sugieren que las células CXCR5⁺CD4⁺ mantienen la expresión de CXCR5⁺.

Se ha demostrado que las células CD4⁺CXCR5⁺ circulantes de sangre periférica tienen una capacidad mayor que las CXCR5⁻ en inducir a las células B a diferenciarse en células productoras de inmunoglobulinas (135-137).

En resumen, estas observaciones muestran que las cTfh son células de memoria y comparten propiedades funcionales con las células Tfh de los órganos linfoides secundarios.

3.4. Diferencias entre las Tfh de los órganos linfoides y las cTfh circulantes

El escepticismo sobre la relación directa entre las células sanguíneas de memoria Tfh y las Tfh de los órganos linfoides secundarios ha sido debido, en parte, a las diferencias fenotípicas. Aunque ambos tipos celulares expresen CXCR5, la expresión de otros

marcadores es muy diferente (133). Una gran parte de las células cTfh de memoria expresan CD62L y CCR7, marcadores asociados con las células T CD4⁺ de memoria central. Los ligandos de CD62L y CCR7 se expresan en el endotelio de las venas de los órganos linfoides y la expresión de estas moléculas probablemente permite que las células Tfh de memoria vayan y patrullen los órganos linfoides secundarios. Por el contrario, las células Tfh de los ganglios linfáticos no expresan CCR7, debido a que la expresión de CCR7 debe estar reprimida cuando las células T migran fuera de la zona de células T a los folículos de células B. Además, en contraste con las GC Tfh, la gran mayoría de células de memoria Tfh en sujetos sanos no tienen expresión de marcadores de activación como el CD69 e ICOS. La población de memoria cTfh no tiene expresión de la proteína Bcl-6 y las GC Tfh si. Aunque Bcl-6 promueve la expresión de muchas de las moléculas características de las Tfh como CXCR5, ICOS, PD1, SAP, CD40L y CXCL13, la ausencia de la expresión de Bcl-6 en cTfh sugiere que no es indispensable para su mantenimiento. Los mecanismos moleculares por los que las cTfh mantienen características Tfh permanece desconocido.

3.5. Diferentes subgrupos de células cTfh, controversia en el inmunofenotipo

Existe controversia para identificar el subgrupo dentro de las cTfh que se correlacione más con la respuesta mediada por anticuerpos. Las cTfh constituyen aproximadamente el 15% de las células T CD4⁺ de memoria en humanos (118, 137-140). Estudios recientes han demostrado que las cTfh están compuestas de poblaciones celulares heterogéneas con diferentes fenotipos. Estas células son CD4⁺, expresan también CXCR5 y se han descrito una variable expresión de PD1, ICOS, mientras que bajan la expresión de Bcl6. Se caracterizan como células de memoria (CD45RA⁻) y tienen la habilidad de estimular la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos. Cuando se activan estas

células, aumentan el producto de Bcl6 e ICOS y producen IL21 para favorecer las funciones de las cTfh.

Lo que más se conoce de las cTfh viene del campo de la autoinmunidad, de la producción de anticuerpos que protegen frente a diferentes enfermedades y de la respuesta a vacunas. Así, la población PD1+CXCR3-CXCR5+ se correlaciona con la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a HIV (135). La población ICOS+CXCR3-CXCR5+ correlaciona con la respuesta a la vacuna de la gripe (139). Con respecto a la autoinmunidad, se ha demostrado que las células CXCR5+CD4+ de sangre periférica comparten propiedades funcionales con las Tfh, y parecen representar un compartimento de memoria circulante. Los pacientes con dermatomiositis juvenil, una enfermedad autoinmune sistémica, presentan aumentadas estas células y esta desviación se correlaciona con la actividad de la enfermedad y la frecuencia de plasmablastos (137). Este estudio sugiere que una pérdida en el equilibrio de los subgrupos Tfh contribuye a la autoinmunidad. Además, el subgrupo de células Tfh circulantes CD4+CXCR5+CCR7^{lo}PD1^{hi} se ha demostrado que correlaciona con índices clínicos de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o el lupus (141).

También, se ha propuesto que la expresión de CXCR3 (C-X-C chemokine receptor type 3), CCR6 (Chemokine receptor 6), CCR7, ICOS y PD1 definen subgrupos de Tfh con diferente capacidad para ayudar a los linfocitos B en la transformación hacia células que producen anticuerpos.

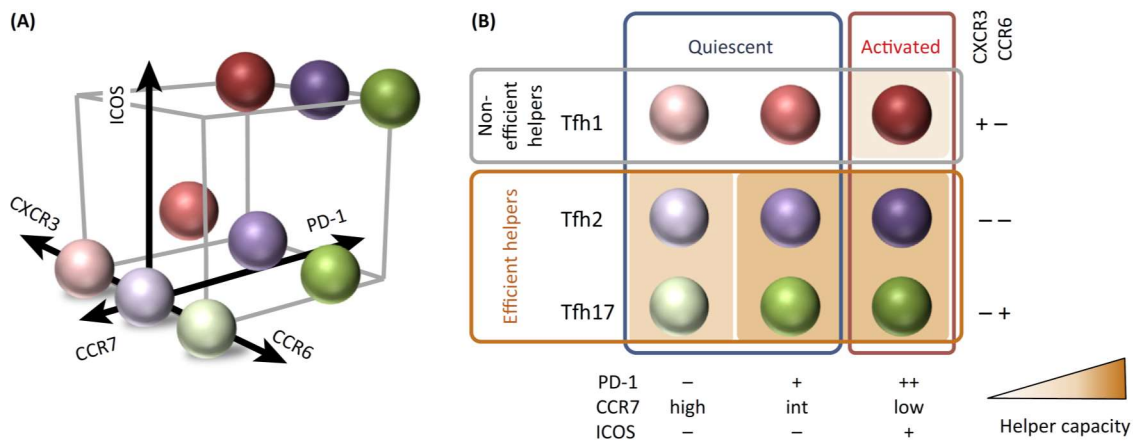


Figura 10. Análisis 3D de los subgrupos de Tfh en función de la expresión de PD1, CCR7, ICOS, CXCR3 y CCR6. Estos subgrupos tienen distintas capacidades para ayudar a las células B [Tomado de Schmitt N. et al. 2014 (133)]

Las células Tfh forman un grupo heterogéneo basado en la expresión de los receptores de quimioquinas CXCR3 y CCR6: CXCR3-CCR6- representan las células Tfh2, CXCR3+CCR6- representan las células Th1 y CXCR3-CCR6+ representan las Tfh17. Estos subgrupos tienen distintas capacidades para ayudar a las células B, las Tfh2 y las Tfh17 promueven la diferenciación de las células B vía secreción de IL21, mientras que las células CXCR3+ Tfh1 no tienen esta función. Además, las células Tfh2 promueven particularmente la secreción IgG e IgE, mientras que las Tfh17 son más eficientes en promover la secreción IgG e IgA (Figura 10).

3.6 Linfocitos T cooperadores foliculares en el trasplante

La importancia de las Tfh en la cooperación con las células B, la formación de centros germinales, la maduración de la afinidad y la generación de las células B de memoria, y células plasmáticas de vida larga está ampliamente aceptada en el contexto de las respuestas inmunológicas a patógenos, vacunación y en la autoinmunidad. Sin embargo, falta conocimiento con respecto a su papel en la aloinmunidad.

Los datos actuales experimentales ponen a las células Tfh en un papel central en la formación de anticuerpos de alta afinidad resultando en el desarrollo de rechazo mediado por anticuerpos (ABMR) (142).

La importancia de la alorreactividad humoral en la disfunción del injerto renal está actualmente bien establecida. El rechazo inmunológico juega un papel importante en la mayoría de los casos de fallo del injerto, y este resultado es más probable después del rechazo mediado por anticuerpos que tras el rechazo mediado por células T. El rechazo mediado por anticuerpos es responsable del 30-50% de los casos de fallo del injerto renal (86). La diferenciación de células B en plasmablastos que produzcan anticuerpos depende de la colaboración de las Tfh.

En un pequeño grupo de trasplantados renales, se identificaron células Tfh periféricas antes y después del trasplante. Estas cTfh tuvieron disminuida su habilidad de producir IL21 ex vivo, pero mantuvieron la habilidad de inducir la diferenciación de las células B vía IL21 y la producción de inmunoglobulinas a pesar de la inmunosupresión. Se demostró que no había diferencias en las población cTfh antes y después de 3 meses del trasplante, ahora bien, en los pacientes con DSA preTx a los 3 meses postTx tenían más células CD4+CXCR5+/ μ L que los que no tenían DSA preTx. De manera interesante, los autores demostraron que las células Tfh colocalizaban con las células B y con inmunoglobulinas en biopsias renales tomadas durante el rechazo, sugiriendo la presencia de estructuras parecidas al folículo en el órgano que estaba rechazando (143) (Figura 11). Esta hipótesis se fundamenta en los datos que se tiene en el campo de la autoinmunidad donde están bien documentado el incremento de las células Tfh. Basándose en estas observaciones, Baan et al. proponen que los problemas de DSA y ABMR en el trasplante son mediados por la producción de IL21 mediante las Tfh en órganos linfoides secundarios y terciarios, abriendo la posibilidad de una posible diana terapéutica (144).

Varios grupos han intentado clarificar el papel de los linfocitos infiltrantes en los injertos y el papel potencial que las inmunoglobulinas localmente producidas podrían tener en el rechazo del injerto. En los estudios con biopsias renales sugieren la presencia de células B en una estructura parecida a un folículo dentro del órgano transplantado. Las células T que expresan Bcl6 colocalizan con las células B que producen inmunoglobulinas dentro del riñón (143,145).

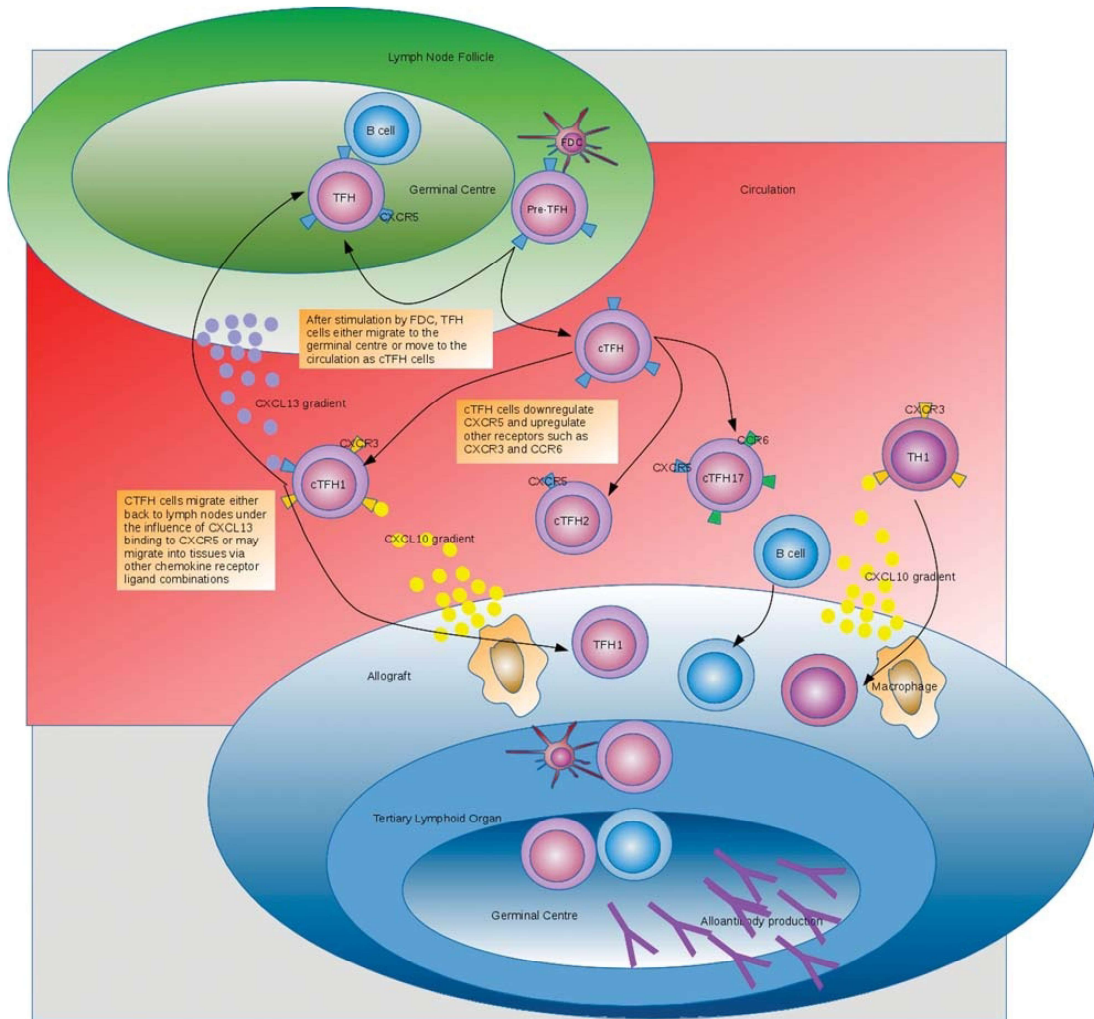


Figura 11. Las células cTfh pueden migrar a zonas de inflamación, como el aloinjerto, donde participan en la formación de órganos linfoides terciarios y en la producción de aloanticuerpos in-situ. [Tomado de Graav GN. et al. 2015 (143)]

Los órganos linfoides terciarios se asocian con el rechazo. Incluso en ausencia de bazo y de órganos linfoides secundarios, los órganos linfoides terciarios son capaces de producir el rechazo. Se ha demostrado en injertos renales humanos que dentro de los órganos linfoides terciarios se produce hipermutación somática de las células B y cambio de isotipo. Por tanto, parece que los linfocitos que se infiltran en el injerto forman agregados linfoides que son capaces de transformarse en órganos linfoides terciarios, responsables de la producción local de anticuerpos donante específicos, que han sido asociados con rechazo a largo plazo del órgano trasplantado.

Otro descubrimiento importante en el campo de las cTfh en el trasplante renal viene de investigaciones en los pacientes Tolerantes Operacionales (TOL), pacientes trasplantados que han suspendido la inmunosupresión, han tolerado el injerto y no han rechazado el riñón trasplantado. En la sangre de estos pacientes el número de cTfh es menor que en pacientes trasplantados renales estables bajo inmunosupresión y funcionalmente sus cTfh son menos eficientes en la producción de anticuerpos (146).

3.7. Las células Tfh como diana de nuevas terapias de inmunosupresión

Basándose en su papel central en la regulación de la inmunidad humoral podría postularse que las células Tfh podrían ser la diana para inhibir el desarrollo de el ABMR (61).

Se conocen varios defectos monogénicos heredables que afectan a la función y diferenciación de las Tfh. Se han caracterizado PBMCs de pacientes con inmunodeficiencias primarias (147-150) y en estos estudios, la pérdida de función de mutaciones en los genes que codifican STAT3, ICOS, BTK (Tirosina quinasa de Bruton), CD40L, NF-KB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) e IL10R redujo el número de células Tfh.

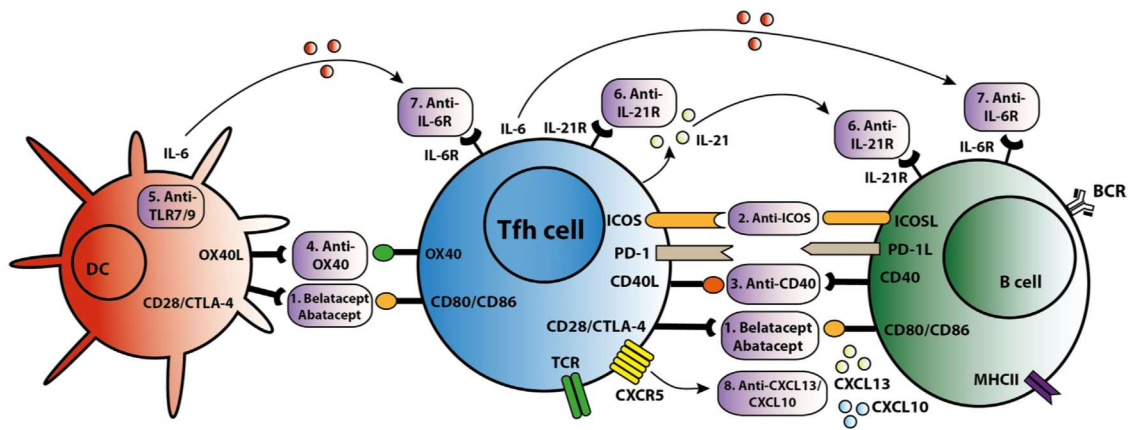


Figura 12. Posibles dianas terapéuticas centradas en las células Tfh. [Tomado de Yan L. et al. 2017 (123)]

Como se observa en la Figura 12, una posible diana terapéutica específica de células Tfh en el proceso de aloreconocimiento es el bloqueo en la señalización de la IL21 (145). La IL21 es posiblemente el marcador más específico de la contribución de las células Tfh a la producción de anticuerpos y podría ser diana para una posible intervención terapéutica. Estudios *in vitro* que consiguen la interrupción de la señalización mediante antagonistas del receptor del IL21 han demostrado que se inhibe la habilidad de la producción de anticuerpos (143). El potencial bloqueo terapéutico del eje IL21/IL21R ha sido comprobado *in vitro*, en cocultivos de cTfh y células B de memoria de células de pacientes trasplantados con células PBMC del donante alogénicas (127). Al añadir a a los cocultivos anticuerpos antiIL21R disminuyó considerablemente la diferenciación a plasmablastos y la producción de inmunoglobulina, además se observó una inhibición dosis dependiente de la fosforilación de STAT3 en células T y B. Esta estrategia podría ser útil en la prevención de alorespuestas humores, sin embargo, se trata de un experimento *in vitro* que debe ser evaluado con más ensayos preclínicos y clínicos.

Continuando en la posible estrategia dirigida al bloqueo de interleuquinas importantes para la diferenciación y función de los linfocitos Tfh también hay que hacer referencia a la IL6. El Tocilizumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea el receptor de la IL6, y está aprobado para el uso de varias enfermedades inmunológicas. En el trasplante, ya hay datos que indican que existe un papel fundamental de la IL6 en el rechazo celular, en el rechazo mediado por anticuerpos y vasculopatía crónica del injerto, lo que sugiere que el bloqueo de IL6/IL6R podría prevenir el alloreconocimiento del injerto y mejorar la supervivencia a largo plazo. La IL6 tiene un papel importante en la inflamación, y la inhibición de esta vía podría reducir la cascada inflamatoria inducida por los anticuerpos (151). En humanos, el tocilizumab podría ser útil en la desensibilización de los pacientes trasplantados de riñón (152,153) y para tratar el rechazo crónico mediado por anticuerpos (111), sin embargo, se necesitan más ensayos clínicos para evaluar el efecto del tocilizumab en pacientes trasplantados.

El bloqueo de la coestimulación podría ser útil para evitar o tratar el rechazo humoral. Las interacciones ICOS/ICOSL y CD40/CD154 se requieren para el mantenimiento de las células Tfh en respuesta al antígeno y se conoce que su estimulación prolongada da lugar a una respuesta humoral exagerada. Por tanto, podrían ser útiles las terapias que bloquean dichas interacciones en el tratamiento de enfermedades mediadas por anticuerpos (154).

Los linfocitos Tfh necesitan recibir una señalización celular a través de CD40L para su activación y diferenciación, así los pacientes con mutaciones en CD40 tienen bajos números de cTfh (155). Se han utilizado anticuerpos antiCD40L con éxito en modelos de autoinmunidad y trasplante en ratón y en primates no humanos inhibiendo la respuesta inmunológica (156). El uso de anticuerpos para bloquear CD40L podría ser una terapia potencial para prevenir la activación de Tfh en el trasplante.

El bloqueo de ICOSL en ratón ha demostrado revertir el fenotipo Tfh, recolocando a estas células desde el folículo de células B a la zona de células T, y reduciendo los niveles de IgG (157). Los pacientes con mutaciones en ICOS sufren de inmunodeficiencia común variable, una enfermedad caracterizada por un bajo número de células B de memoria e IgG baja en suero(158). El bloqueo de ICOS/ICOSL es una terapia prometedora para prevenir la producción de DSA, pero hacen falta más estudios y ensayos clínicos.

Además, siguiendo en la línea del bloqueo de la coestimulación, las células Tfh dependen de CD28 para su supervivencia y función. Además de bloquear CD80/CD86 usando CTLA4-Ig (abatacept o belatacept), se podría utilizar un anticuerpo frente a CD28. El bloqueo selectivo de CD28 en un modelo murino ha demostrado una mejora en la supervivencia del injerto comparado con CTLA4-Ig, atenuando la función efectora de las células T CD8⁺ de memoria (159) e inhibiendo a las células Tfh (160). Estos resultados son prometedores y justifican hacer más estudios para bloquear selectivamente CD28 como una nueva terapia para limitar la función de las Tfh y la formación de DSA en el trasplante.

Otra posible diana terapéutica puede ser OX40/OX40L (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4, también CD134). OX40 es un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral y es una molécula coestimuladora potente para las células T. Su ligando, OX40L, se expresa en células presentadoras de antígenos y participa en la patogénesis de enfermedades autoinmunes favoreciendo a las Tfh (161). Se ha usado una proteína de fusión antiOX40 en un modelo de rechazo de corazón y ayudó a prevenir el rechazo del injerto (162). El bloqueo in vitro de OX40/OX40L redujo la secreción de IL4 e INF γ (Interferón Gamma) por parte de células T de pacientes trasplantados de riñón (163). Hacen falta más experimentos sobre el efecto específico que ocasiona el bloqueo en OX40/OX40L en Tfh para prevenir el rechazo.

Otra posible opción terapéutica podría tener como objetivo los factores de transcripción necesarios para el desarrollo de las Tfh. Un ejemplo de este grupo sería STAT3 que está implicado en la regulación positiva de Bcl6 necesaria para la diferenciación de las Tfh (164) y en la señalización del IL21R. Además STAT3 es un regulador importante de la diferenciación de las células B, se ha demostrado que las mutaciones en STAT3 reducen de manera importante la capacidad de las células B para diferenciarse en células plasmáticas (165). El desarrollo de inhibidores de STAT3 es un campo activo dentro de la oncología. Los primeros fármacos con inhibidores de STAT3 presentaron mucha toxicidad debido probablemente a que STAT3 está ampliamente expresada en el organismo e implicado en diversas funciones fisiológicas, incluyendo la modulación del sistema inmunológico(166). Actualmente se han desarrollado nuevos inhibidores de STAT3 con unos perfiles tóxicos más favorables, como el bruceantínol que inhibe la unión de STAT3 al ADN (Ácido desoxirribonucleico) y ha demostrado una actividad antineoplásica in vitro e in vivo en modelos de cáncer (167). En trasplante no está descrito su utilidad pero podría postularse como una posible diana terapéutica contra las cTfh.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

Las células Tfh proporcionan la interacción necesaria para que las células B den lugar a células plasmáticas y se origine una respuesta inmune humoral. Estas células podrían contribuir al deterioro del injerto renal si favorecieran la producción de anticuerpos contra el órgano trasplantado.

El objetivo global de esta Tesis Doctoral es el estudio de las células cTfh en el trasplante renal, planteando los siguientes objetivos concretos:

1. Demostrar la capacidad funcional de las cTfh en pacientes con ERC antes del trasplante y en pacientes trasplantados renales 6 meses después del trasplante.
2. Cuantificar prospectivamente las células cTfh en una cohorte de pacientes con enfermedad renal crónica y analizar su evolución tras el trasplante renal.
3. Estudiar el efecto que tiene la enfermedad renal crónica y la diálisis sobre las cTfh antes del trasplante.
4. Determinar cómo influye sobre las células cTfh haber estado expuesto a aloantígenos antes del trasplante renal.
5. Analizar el efecto de la terapia de inducción sobre las células cTfh después del trasplante.
6. Evaluar la relación entre los niveles de cTfh y el desarrollo de anticuerpos antiHLA después del trasplante.
7. Estudiar si existe relación entre las células cTfh antes del trasplante y la aparición de rechazo.
8. Examinar la relación entre el virus CMV y la población cTfh.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. COHORTE DE PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES

En 2013, un consorcio de grupos del Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre obtuvo una ayuda del ISCIII (Instituto de salud Carlos III) del Programa Proyectos Integrados de Excelencia para investigar en trasplante de órgano sólido (Figura 13). La presente tesis se enmarca en el contexto de este Proyecto Integrado de Excelencia en trasplante (PIE13/00045).

Desde noviembre de 2014 a junio de 2016 esta red incluyó a todos los pacientes que recibieron un trasplante renal, generando una cohorte con un total de 206 pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital 12 de Octubre y los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de entrar en el estudio.

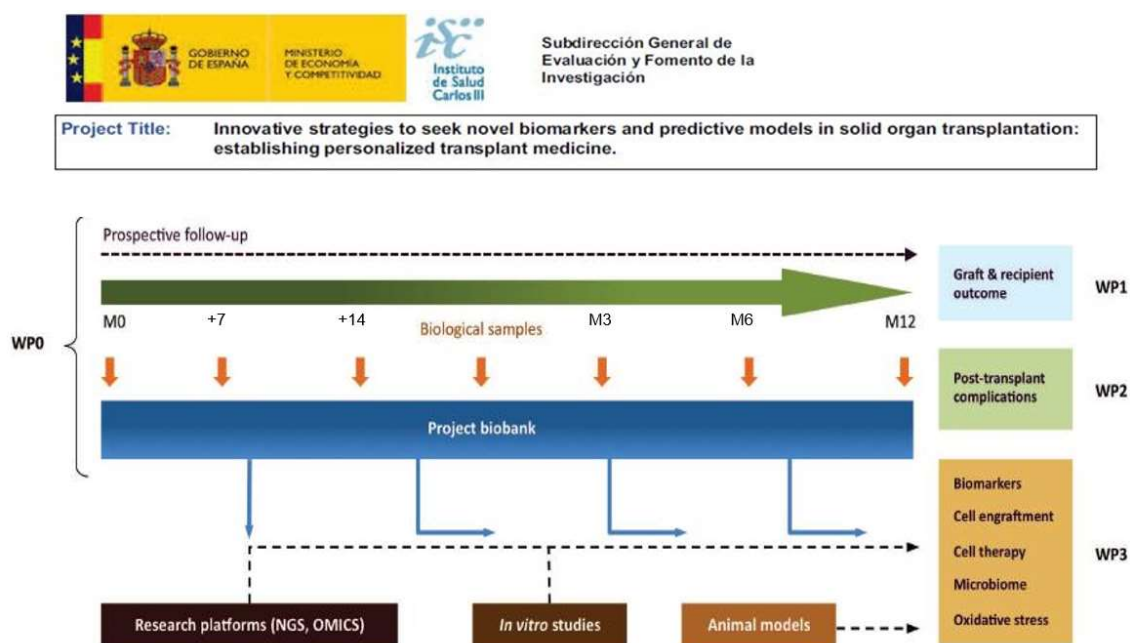


Figura 13. Cronograma de la extracción de muestras y los diferentes grupos de trabajo.

Se tomaron muestras a preTx y postTx a 7 y 14 días y a 1, 3, 6 y 12 meses. Esta cohorte fue seguida de manera prospectiva durante un año postTx y se recogieron variables clínicas y datos inmunológicos. En aquellos pacientes con sospecha de rechazo se

realizaron biopsias para su confirmación. El evento de rechazo se definió como rechazo agudo probado por biopsia de acuerdo con la clasificación de Banff de 2015 (30).

Además se estudió un grupo de personas no trasplantadas (controles sanos), pareado en edad y sexo con los pacientes, para las comparaciones realizadas con la cohorte de pacientes trasplantados.

2. FENOTIPADO DE LINFOCITOS T COOPERADORES FOLICULARES CIRCULANTES

2.1 Aislamiento de PBMCs

Los linfocitos totales de los pacientes se obtuvieron a partir de sangre total recién extraída, recogida en tubos con EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (BD) y fueron analizados mediante citometría de flujo en el mismo día.

Para el aislamiento de las células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) se utilizó la centrifugación diferencial con Ficoll-Paque (limphoprep® Fresenius Kabi Norge AS, Oslo, Noruega) con una densidad $1.077 \pm 0.001 \text{ g/mL}$ (20°C), una osmolaridad $290 \pm 15 \text{ mOsm}$ y conservado por debajo de 20°C , protegido de la luz.

Primero se diluyó la sangre a $\frac{1}{2}$ con medio RPMI (medio celular Roswell Park Memorial Institute) +1% de una mezcla antibiótica de penicilina (10.000 Uds) y estreptomycin (10mg/ml) (Penicillin-Streptomycin, Sigma Aldrich, St Louis, EEUU). Después, la sangre diluida se añadió sobre una columna de Ficoll-Paque procurando evitar que las dos fases se mezclasen. Posteriormente se centrifugó 20 minutos a 2400 rpm (aprox. 350G) con la centrífuga en freno: 3/10 y aceleración: 5/10. De la interfase resultante se extrajo la nube de PBMC que fueron lavados con medio RPMI con 1% de antibiótico (centrifugación 7 min a 1400 rpm). Se contaron las células en cámara de Neubauer y se separaron 2×10^6 PBMC para su análisis por citometría de flujo.

2.2. Análisis de cTFH por citometría de flujo

Se lavaron 2×10^6 PBMC con FACS Buffer (tampón citometría flujo) para evitar uniones inespecíficas (PBS (tampón fosfato) + 0,5% BSA (albúmina sérica bovina) + 0,01% Azida sódica) (centrifugación 7 min a 1400 rpm). En un volumen final de 50 μ L se añadieron los anticuerpos monoclonales descritos en la Tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el marcaje de las poblaciones celulares cTfh.

Anticuerpo	Fluorocromo	Volumen (Vol.final:50 μ L)	Marca comercial
Anti-CD4	FITC	5 μ L	BD Bioscience
Anti-CXCR5	APC	0,5 μ L	BD Bioscience
Anti-CCR7	PerCP-Cy5.5	2,5 μ L	BD Bioscience
Anti-PD1	PE	2,5 μ L	BD Bioscience

Transcurridos 30 minutos en hielo y oscuridad se lavaron las muestras de nuevo con FACS Buffer y se adquirieron con el citómetro BD-FACS Canto II y el programa FACS Diva. Mediante el análisis con el software Flow Jo V10 (Tree Star Inc.) se estudiaron los porcentajes de células cTfh, definidas como CD4+CXCR5+ o CD4+CXCR5+CCR7loPD1hi, sobre linfocitos CD4+ y sobre linfocitos totales, con la estrategia de selección de la Figura 14. Dado que el mismo día de la extracción de sangre para el estudio los pacientes también se hicieron sus analíticas de rutina, fue posible calcular los números absolutos de células cTfh por μ L (CXCR5+/ μ L y CXCR5+CCR7loPD1hi/ μ L) utilizando la cifra de linfocitos por μ L del hemograma.

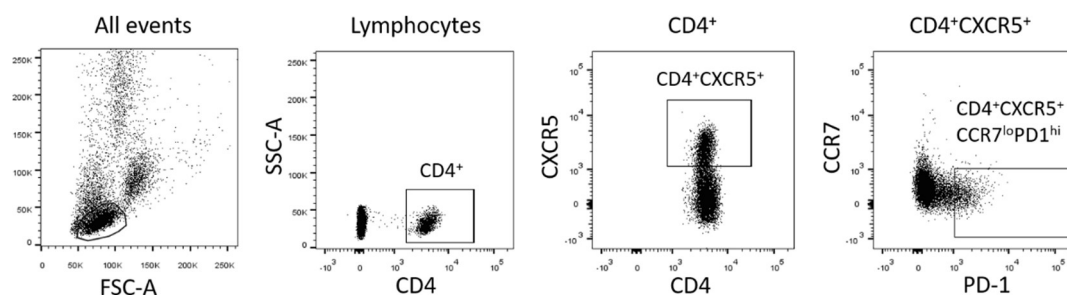


Figura14 . Estrategia de selección para el análisis de los linfocitos cTfh. Se seleccionaron los linfocitos en función del FSC (Forward Scatter) y SSC (side scatter). De la población de linfocitos se seleccionaron las células CD4+, y de éstas, las CXCR5+. De la población de células CD4+CXCR5+ se seleccionaron las células CCR7^{lo}PD1^{hi}. Consideramos cTfh tanto el fenotipo CD4+CXCR5+ como el CD4+CXCR5+CCR7^{lo}PD1^{hi}.

3. ENSAYO FUNCIONAL IN VITRO DE LINFOCITOS TFH

3.1. Cultivo de cTfh y células B de memoria

Para determinar si las cTfh conservan su capacidad de inducir la diferenciación de la células B a plasmablastos, de manera similar a las Tfh de un órgano linfoide secundario, se llevaron a cabo cocultivos de cTfh con células enriquecidas en B de memoria.

Para ello, se recogieron 32 mL de sangre de pacientes con enfermedad renal crónica en tubos con heparina de litio (BD). Los pacientes seleccionados incluyeron: 7 pacientes en programas de hemodiálisis y 9 pacientes trasplantados a 6 meses postTx. Se aislaron los PBMC mediante gradiente de ficoll tal como se describió anteriormente. Los PBMC se marcaron con los anticuerpos monoclonales indicados en la Tabla 3. Las cantidades de anticuerpo requeridas para marcar 30-40 x 10⁶ PBMC se calcularon mediante titulación. Las células Tfh periféricas (CD3+CD4+CXCR5+), (CD3+CD4+CXCR5-) y las células B de memoria (CD19+CD27+) se aislaron utilizando un citómetro sorter (BD InfluxTM). Ver estrategia de separación celular en la Figura 15.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en la separación de las distintas poblaciones. Las cantidades de anticuerpos fueron tituladas para 30-40 x10⁶ PBMC.

POBLACIÓN CELULAR	Anticuerpo	Fluorocromo	Volumen (Vol.final:200µL)	Marca comercial
Tfh	Anti-CD3	PECy7	8	BD Bioscience
Tfh	Anti-CD4	FITC	27	BD Bioscience
Tfh	Anti-CXCR5	APC	3,6	BD Bioscience
B memoria	Anti-CD19	PE	27	BD Bioscience
B memoria	Anti-CD27	APCH7	11	BD Bioscience

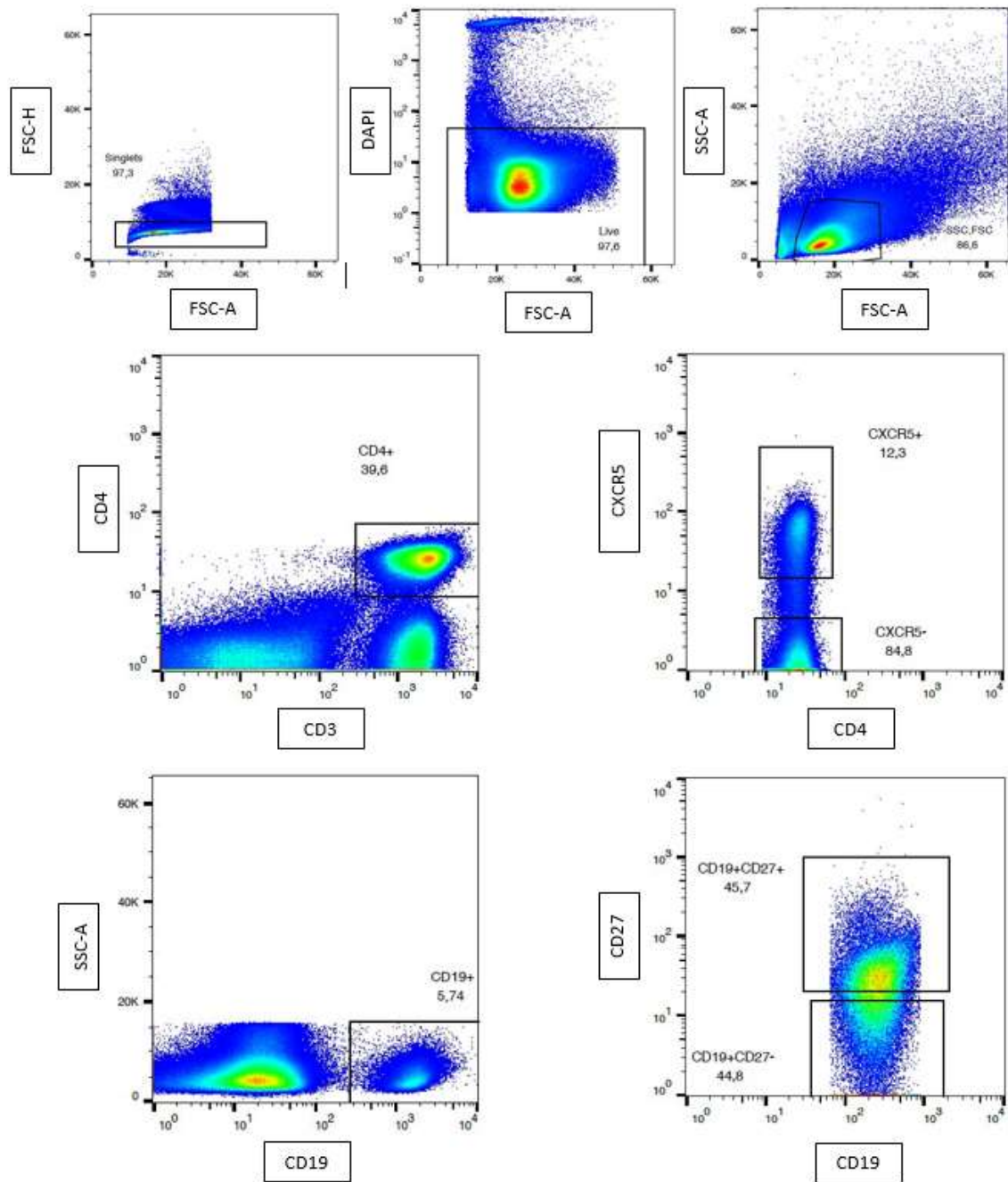


Figura 15. Estrategia para la separación por citometría de las células cTfh (CD3+CD4+CXCR5+), no-cTfh (CD3+CD4+CXCR5-) y B de memoria (CD19+CD27+) a partir de PBMCs. Se seleccionaron los singlets en función del FSC-A y FSC-H, y las células con viabilidad que no captaron DAPI. Se seleccionaron los linfocitos por su tamaño y complejidad y a partir de ahí se seleccionaron los linfocitos T CD3+CD4+CXCR5+ y CD3+CD4+CXCR5-, y los linfocitos B CD19+CD27+.

Primero se excluyeron los dobletes, se seleccionaron las células vivas (DAPI-) y en función del FSC y SSC se seleccionaron los linfocitos. De los linfocitos totales, se seleccionan las células CD4⁺ por un lado y las CD19⁺ por otro. De los linfocitos CD4⁺, se separaron las células CXCR5⁺ y las CXCR5⁻, y de los CD19⁺, se separaron las células CD27⁺.

Tras la separación celular, las células B de memoria se cocultivaron con células cTfh durante 7 días en presencia del superantígeno SEB (*Staphylococcus aureus* antigen B, Sigma-Aldrich, 1µg/mL) para favorecer la activación de los linfocitos y la diferenciación de las células B a células plasmáticas (Figura 16). Como control negativo, se cocultivaron células B de memoria con células no Tfh, que a priori no cooperan con los linfocitos B para su diferenciación a células plasmáticas. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos, con una proporción Bmem:Tfh/noTfh de 1:1, es decir, 50,000 células de cada tipo celular. El volumen en cada pocillo fue de 220ul y el medio empleado 1% glutamina (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.), 1% Penicilina-Estreptomicina (Sigma-Aldrich), 10% FBS (F7524, Sigma-Aldrich), y 88% RPMI (Sigma- Aldrich). No se hicieron cambios de medio durante la semana del cultivo y las células se mantuvieron a 37°C y 5%CO₂.

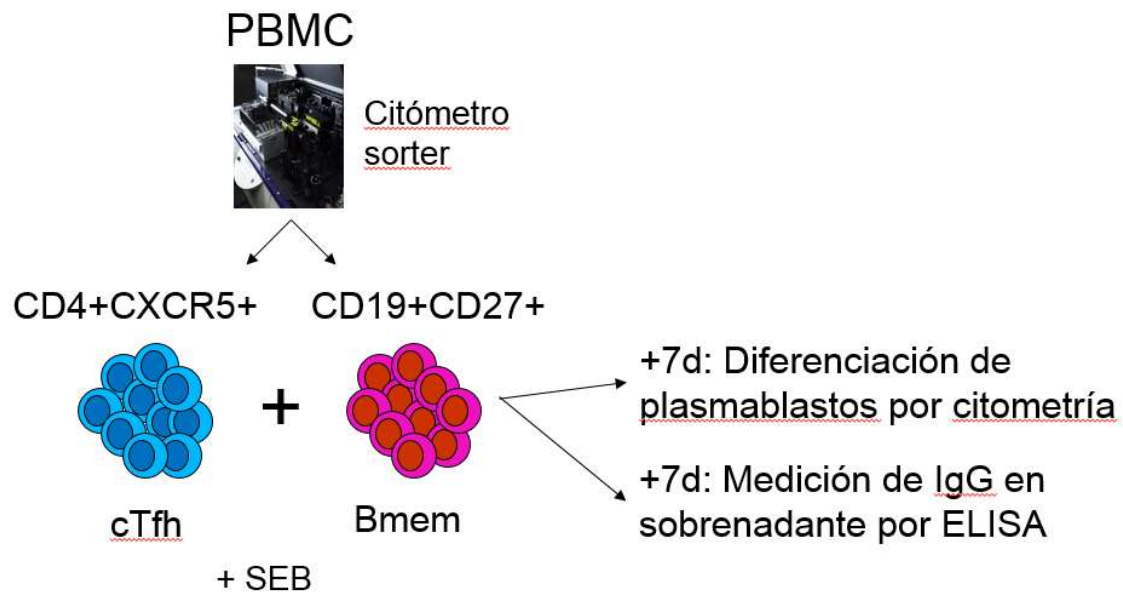


Figura 16. Resumen esquemático del cocultivo Bmem:cTfh, incluyendo la separación celular de cTfh y Bmem, y las técnicas para evaluar la función de las cTfh como el análisis de la diferenciación de plasmablastos por citometría y la medición de IgG en el sobrenadante de los cultivos mediante ELISA.

3.2. Análisis de plasmablastos por citometría de flujo

Transcurridos 7 días, se recogieron y almacenaron a -20°C los sobrenadantes de los cocultivos para un análisis posterior de la producción de anticuerpos. Las células se utilizaron para determinar mediante citometría de flujo la diferenciación de las células B de memoria a plasmablastos, que son precursores de las células plasmáticas. El marcaje celular se realizó con los anticuerpos monoclonales indicados en la tabla 4. Las células se adquirieron usando el citómetro BD Canto II y el programa FACS Diva, y los datos se analizaron con el programa FlowJo. Los plasmablastos se definieron como células $\text{CD19}^{+}\text{CD27}^{\text{hi}}\text{CD38}^{\text{hi}}$, siguiendo la estrategia de análisis mostrada en la Figura 17.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en el marcaje de plasmablastos tras 7 días de cocultivo.

POBLACIÓN CELULAR	Anticuerpo	Fluorocromo	Volumen (Vol.final:50µL)	Marca comercial
plasmablastos	Anti-CD19	PE	2,5 µL	BD Bioscience
plasmablastos	Anti-CD27	APC-H7	2,5 µL	BD Bioscience
plasmablastos	Anti-CD38	FITC	2,5 µL	BD Bioscience
plasmablastos	-	DAPI	1,5 µL(0,3 µg)	Sigma

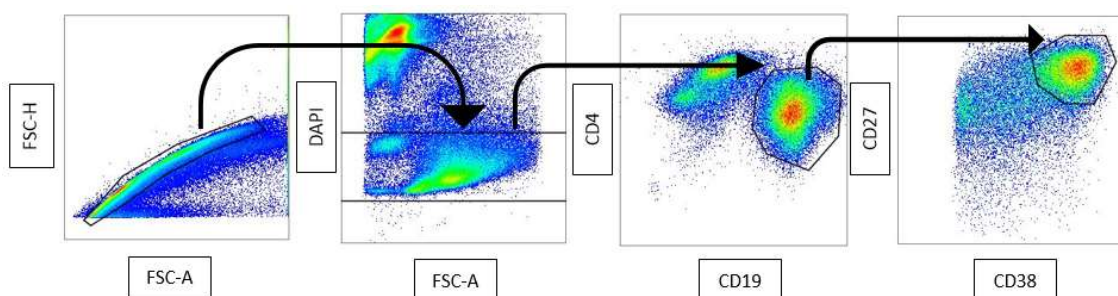


Figura 17. Estrategia de selección de plasmablastos. Primero se seleccionan los singletes, luego aquellas células negativas para DAPI (células vivas), dentro de estas los linfocitos B (CD19+CD4-), y finalmente dentro de los linfocitos B los plasmablastos (CD27hiCD38hi)

3.3. Medición de IgG en los sobrenadantes de los cocultivos

Para evaluar la capacidad de producción de anticuerpos de los plasmablastos diferenciados a partir del cocultivo con cTfh, se evaluó la presencia de IgG en los sobrenadantes de los cocultivos mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, ELISA sándwich, de elaboración casera en una placa de 96 pocillos (Figura 18). Para el coating de la placa se utilizó el anticuerpo MCA647, clon: MK 1A6 (AbD Serotec, Kidlington, UK) a una concentración de 4 µg/mL diluido en tampón carbonato/bicarbonato 0,1M. Para generar la curva patrón se utilizó una IgG comercial

(Grifols) de concentración conocida, utilizada en el trabajo de rutina del hospital. El anticuerpo secundario elegido fue: STAR106P a una concentración de 2µg/mL (AbD Serotec) diluido en PBS-T y el sustrato OPD-urea (SIGMAFAST™, Sigma). Los sobrenadantes de los cocultivos se incubaron durante una hora en agitación y temperatura ambiente. Tras los lavados, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, y se incubó durante una hora en agitación y temperatura ambiente. Tras lavar, se añadió el sustrato OPD-urea y se incubó 5 minutos en oscuridad. Para parar la reacción se utilizó ácido sulfúrico 1M.

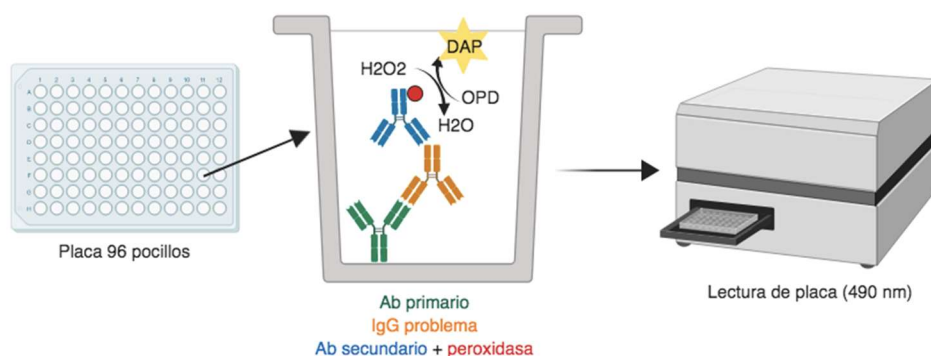


Figura 18: ELISA sándwich de elaboración casera para la cuantificación de IgG en sobrenadantes de cultivos celulares. Tomado de: Trabajo fin de grado Ana de Lope.

4. DETECCIÓN DE IgG EN SUERO

Las determinaciones de inmunoglobulina IgG en suero de los pacientes se realizaron en un equipo de nefelometría Image 800 (Beckman Coulter, California, EEUU) y reactivos suministrados por el fabricante de equipo. Se consideró rango de normalidad en adultos concentraciones comprendidas entre 700 y 1400mg/dL.

5. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIHLA

El análisis de los anticuerpos antiHLA fue realizado en todos los pacientes preTx y postTx en suero mediante citometría de flujo basada en microesferas (Tecnología Luminex, LABScreen Mixed kit, One Lambda, CA) (figura 19). Las muestras de suero no se diluyeron para la detección de anticuerpos. Se utilizó el kit LABScreen Mixed (LSM, One Lambda) para la detección de anticuerpos antiHLA. La señal fluorescente para cada microesfera recubierta fue medida usando la citometría LABScan 100 y analizada por el software HLA-Fusion (One Lambda). El test se consideró positivo cuando la intensidad de fluorescencia standard (SFI) estaba por encima de 40000 para microesferas antiHLA de clase I y clase II. Los anticuerpos antiHLA que se desarrollaron tras el trasplante se consideraron anticuerpos antiHLA de novo. En las muestras que fueron positivas para anticuerpos antiHLA se determinó la especificidad de estos anticuerpos mediante el kit LABScreen Single Antigen (LSA, One Lambda). Se consideraron positivas las especificidades con una intensidad de fluorescencia media (MFI) superior a 500.

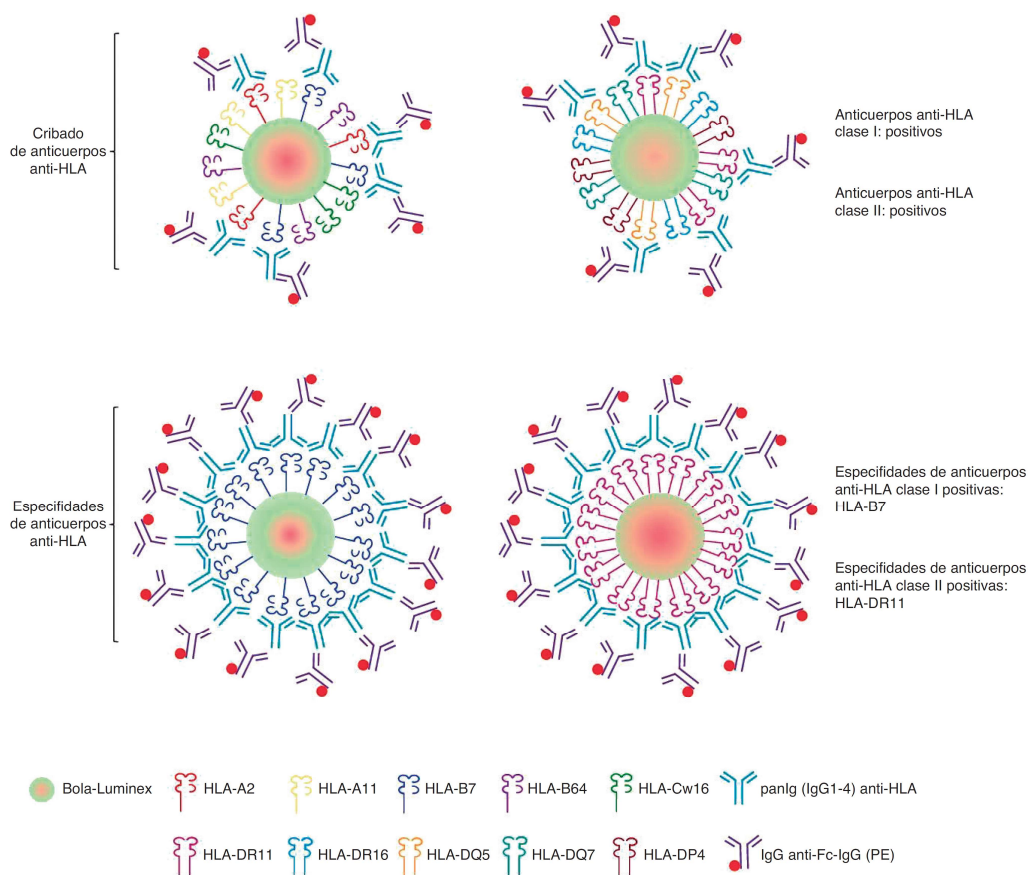


Figura 19. Tecnología Luminex para la detección de anticuerpos antiHLA: cribado y definición de especificidades. [Tomado de Molina J. et al. 2018 (45)]

6. DETECCIÓN DE VIREMIA Y SEROLOGÍA DE CMV

La cuantificación de la viremia de CMV se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real. La Extracción de ADN se hizo en la plataforma Nimbus (Hamilton) que también realizó la preparación de todos los reactivos necesarios para la PCR. El ADN extraído de sangre humana total con EDTA, fué el material de base del RealStar® CMV PCR Kit 1.0 (Altona). El termociclador que se utilizó fue el CFX96 (BioRad). Se consideró viremia CMV positiva una carga viral superior a 1000 copias.

La serología frente a CMV se determinó en el equipo Architect i4000 (Abbott). Mediante ensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) se determinó la presencia de anticuerpos IgG frente CMV en suero de los pacientes.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las poblaciones celulares medidas se estratificaron según las variables clínicas estudiadas y sus distribuciones se compararon con el test estadístico U Mann-Whitney. La correlación entre dos variables se analizó usando el test de Spearman y se representó mediante una gráfica de puntos y recta de regresión. Para analizar la asociación entre cTfh y el rechazo agudo se tuvieron en cuenta el número de días desde el trasplante hasta el rechazo. Se utilizó la regresión de Cox para estimar el impacto preTx de cTfh en el rechazo, se calculó el Hazard ratio con un intervalo de confianza del 95%. Los test estadísticos se realizaron con Stata 13.0 y SAS 9.3. Los valores $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. En las gráficas, * representa $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LA COHORTE

Para el estudio de las células cTfh en el trasplante renal se incluyeron 206 pacientes receptores de un trasplante de riñón y se siguieron prospectivamente durante un año. La tabla 5 muestra las principales características de la cohorte estudiada. La mediana de edad es 56 años y la mayoría de los pacientes estudiados son hombres (70,39%), en hemodiálisis periódica (75,24%) y que recibieron su primer trasplante renal (85,92%) de donantes en muerte encefálica (61,17%). La primera causa del deterioro de la función renal de estos pacientes fue la nefropatía diabética (37%), seguida de la poliquistosis renal (26%) y la glomerulonefritis IgA (18%). Según el riesgo de rechazo los pacientes recibieron una terapia de inmunosupresión de inducción con basiliximab (40% de los pacientes) o timoglobulina (45%). Después del trasplante todos los pacientes recibieron como inmunosupresión de mantenimiento tacrolimus, micofenolato mofetil y glucocorticoides. 18 pacientes (8,7%) sufrieron al menos un episodio de BPAR en el año de seguimiento postTx que se llevó a cabo.

Tabla 5. Características de la cohorte de pacientes trasplantados renales

VARIABLE	N	%	MEDIANA	P25	P75	MIN	MAX
TRASPLANTE RENAL	206	100
SEXO							
HOMBRE	145	70,39
MUJER	61	29,61
EDAD							
CONJUNTA	206	100	56	44	67	16	83
HOMBRE	145	70,39	58	44	67	19	83
MUJER	61	29,61	54	46	66	16	80
ENFERMEDAD DE BASE							
GLOMERULONEFRITIS MEMBRANOPROLIFERATIVA	4	1,94
GLOMERULONEFRITIS FOCAL Y SEGMENTARIA	13	6,31
GLOMERULONEFRITIS NEFROPATÍA IgA	18	8,74
OTRA GLOMERULONEFRITIS	15	7,28
NEFROPATÍA DIABÉTICA	37	17,96
NEFROANGIOESCLEROSIS HIPERTENSIVA	17	8,25
POLIQUISTOSIS RENAL	26	12,62
NEFROPATÍA POR REFLUJO	8	3,88
VASCULITIS	4	1,94
AMILOIDOSIS	3	1,46
NEFRONOPTISIS	1	0,49
NEFROPATÍA POR AINES	1	0,49
TUBULOINTERSTICIAL	10	4,85
OTRA NEFROPATÍA CONGÉNITA	7	3,4
DESCONOCIDA	25	12,14
OTRA	17	8,25
TIPO DE DIÁLISIS							
PREDIÁLISIS	17	8,25
DIÁLISIS PERITONEAL	32	15,54
HEMODIÁLISIS PERIÓDICA	155	75,24
NO REGOGIDO	2	0,97
DÍAS EN DIÁLISIS							
DÍAS EN DIÁLISIS	191	92,72	420	210	930	0	6120
NO RECOGIDO	15	7,28
TIPO DE DONANTE							
MUERTE ENCEFÁLICA	126	61,17
ASISTOLIA	53	25,73
VIVO	27	13,1

Tabla 5. Características de la cohorte de pacientes trasplantados renales (continuación)

VARIABLE	N	%	MEDIANA	P25	P75	MIN	MAX
TIPO DONANTE AMPLIADO							
MUERTE ENCEFÁLICA	126	61,16
ASISTOLIA NO CONTROLADA	17	8,25
ASISTOLIA CONTROLADA	17	8,25
VIVO	27	13,1
NO RECOGIDO	19	9,24					
FUNCIÓN DEL INJERTO							
FUNCIÓN INMEDIATA	97	47,08
RETRASO EN LA FUNCIÓN DEL INJERTO	108	52,43
NO RECOGIDO	1	0,49					
NÚMERO DE TRASPLANTE							
1	177	85,92
2	21	10,19
3	4	1,94
4	4	1,94
RETRASPLANTE							
SÓLO UN TRASPLANTE	177	85,92
RETRASPLANTE	29	14,08
TRANSFUSIONES PREVIAS							
NO (0)	94	45,63
SI (1-50)	81	39,32
NO RECOGIDO	31	15,05					
SEROLOGÍA VHC							
NEGATIVO	189	91,74
POSITIVO	14	6,8
NO RECOGIDO	3	1,46					
SEROLOGÍA CMV ESTATUS DONANTE/RECEPTOR							
+/+	146	70,87
+/-	21	10,19
-/+	22	10,68
-/-	6	2,91
NO RECOGIDO	11	5,35					
INDUCCIÓN							
TRIPLE TERAPIA NO INDUCCIÓN	23	11,17
TIMOGLOBULINA	93	45,14
BASILIXIMAB	83	40,29
RITUXIMAB	3	1,46
NO RECOGIDO	4	1,94					

Tabla 5. Características de la cohorte de pacientes trasplantados renales (continuación)

VARIABLE	N	%	MEDIANA	P25	P75	MIN	MAX
INCOMPATIBILIDADES HLA							
0	2	0,97
1	5	2,43
2	19	9,22
3	33	16,02
4	50	24,27
5	61	29,61
6	33	16,02
NO RECOGIDO	3	1,46					
ANTICUERPOS antiHLA preTx							
NO ANTICUERPOS	167	81
SI ANTICUERPOS	39	19
ANTI HLA CLASE I	11	5					
ANTI CLASE II	5	3					
ANTI CLASE I+II	23	11					
ANTI HLA DSA	2	0,96					
ANTICUERPOS antiHLA postTx (antes/después del trasplante (seguimiento un año))							
+/+	34	16,5
-/+	12	6
-/-	141	68,5
NO RECOGIDO	19	9
RECHAZO (BPAR)							
NO	188	91,26
SI	18	8,74

2. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE LAS cTFH PRETRASPLANTE (PRETX) Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

2.1. Demostración de la capacidad funcional de las cTfh en pacientes con ERC

Se demostró que las células T CD4+CXCR5+ que se midieron en sangre periférica de los pacientes con ERC fueron capaces de diferenciar a la células B en plasmablastos productores de inmunoglobulinas y que se pueden considerar representativos de las células Tfh de los órganos linfoides secundarios. Se pusieron en cocultivo células CD4+CXCR5+ y células CD4+CXCR5- de personas no trasplantadas sanas con células B de memoria y se cuantificó la formación de plasmablastos. También se hizo lo mismo con las células de los pacientes con ERC. Como se observa en la Figura 20A, la transformación de células B en plasmablastos fue significativamente superior en los cultivos con células CD4+CXCR5+ que en los cultivos con células CD4+CXCR5-. De forma análoga, la cantidad de IgG fue superior en los sobrenadantes de los cultivos con CD4+CXCR5+. Por tanto, las células que se analizaron en sangre periférica fueron funcionalmente similares a las células Tfh y se pueden considerar como cTfh.

Las células cTfh de pacientes con ERC mantuvieron la capacidad de diferenciar a las células B en plasmablastos de manera similar a los de los controles sanos. Sin embargo, los plasmablastos de los pacientes con ERC produjeron menos IgG que los controles sanos, como se observa en la Figura 20B.

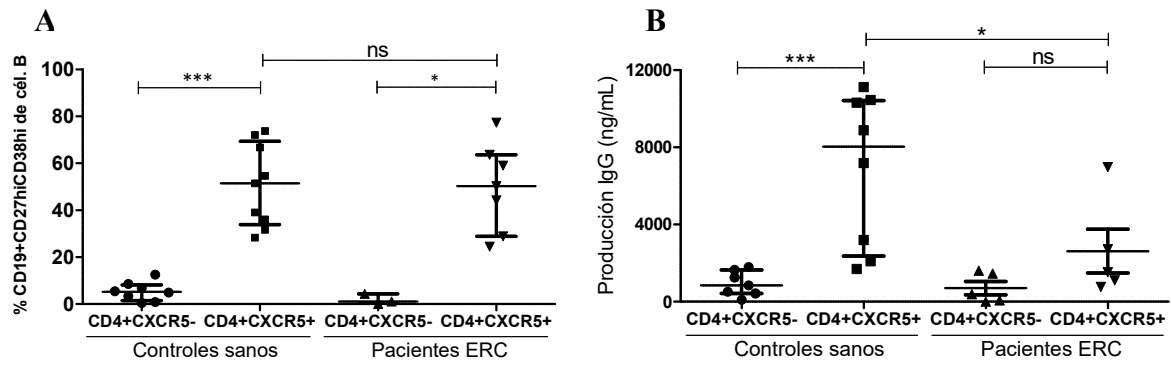


Figura 20. Producción de plasmablastos (CD19+CD27hiCD38hi) y producción de inmunoglobulinas en pacientes con ERC. A, En los cultivos con células CD4+CXCR5+ se diferenciaron más plasmablastos que en los cultivos con CD4+CXCR5-, tanto si las células provenían de controles sanos o de pacientes con ERC. B, De manera similar, la producción de IgG fue mayor en los cultivos con células CD4+CXCR5+ que con CD4+CXCR5-, aunque los pacientes produjeron menos IgG que los controles.

2.2. Descripción de cTfh en pacientes preTx y en controles sanos

Para el estudio de los linfocitos cTfh se incluyeron 206 pacientes receptores de trasplante renal. De ellos, la muestra preTx pudo obtenerse en 154 pacientes de la cohorte. Las poblaciones celulares evaluadas aparecen en la la tabla 5. Se valoraron 139 pacientes con el inmunofenotipo %CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4 preTx. Para el cálculo de los números absolutos de estas poblaciones se tuvo en cuenta el hemograma del mismo día y así se incluyeron los pacientes donde se determinaron los números absolutos de células descritas en la tabla 6. Se incluyeron 13 controles sanos no trasplantados, sin ERC, pareados en edad y sexo, descritos en la tabla 7.

Tabla 6. Fenotipo y frecuencia de las cTfh en los pacientes con ERC preTx. (*)

VARIABLE	N	%	MEDIANA	P25	P75	MIN	MAX
CÉLULAS cTFH							
%CXCR5+ de CD4 preTx	154	.	14,35	11,6	19,4	2,72	50
%CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4 preTx	139	.	0,85	0,5	1,35	0,037	5,14
%CXCR5+ de linfocitos preTx	154	.	4,93	2,33	6,88	0,0046	19,66
%CXCR5+CCR7loPD1hi de linfocitos preTx	139	.	0,24	0,13	0,45	0,0037	1,59
Número absoluto Células CXCR5+/μL preTx	151	.	78,27	35,69	127,62	0,037	354,012
Número absoluto Células CXCR5+CCR7loPD1hi/μLpreTx	135	.	3,74	2,05	7,7	0,396	28,62

(*) Se analizó la frecuencia de células CXCR5+ sobre los linfocitos CD4+ y sobre el total de linfocitos, y la frecuencia de células CXCR5+CCR7loPD1hi sobre los linfocitos CD4+ y sobre el total de linfocitos. Además se calcularon los números absolutos de células CD4+CXCR5+ y CD4+CXCR5+CCR7loPD1hi.

Tabla 7. Fenotipo y frecuencia de cTfh en controles sanos. (**)

VARIABLE	N	%	MEDIANA	P25	P75	MIN	MAX
CÉLULAS cTFH							
%CXCR5+ de CD4 controles	13	.	17,8	15,3	22	9,11	33,8
%CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4 controles	11	.	1,13	0,99	1,59	0,47	4,06
%CXCR5+ de linfocitos controles	13	.	8,12	6,27	8,96	4,36	15,85
%CXCR5+CCR7loPD1hi de linfocitos controles	11	.	0,51	0,41	0,66	0,18	1,91

(**) Se analizó la frecuencia de células CXCR5+ sobre los linfocitos CD4+ y sobre el total de linfocitos, y la frecuencia de células CXCR5+CCR7loPD1hi sobre los linfocitos CD4+ y sobre el total de linfocitos. No se pudieron calcular los números absolutos de estas poblaciones al no disponer de hemograma de los controles sanos.

2.3. Efecto de la ERC, enfermedad de base y sexo de los pacientes sobre las cTfh

En la ERC se produce una acumulación en la sangre de productos tóxicos que puede afectar a las poblaciones celulares circulantes en sangre periférica. En estado general normal estos productos, como la urea y la creatinina, son eliminados por el riñón y se hayan retenidos por un trastorno del funcionamiento renal. Estos pacientes presentan inmunodeficiencia asociada a la uremia con linfopenia y una función alterada de las células del sistema inmunológico.

En este estudio se encontró que las células cTfh están disminuidas en pacientes con ERC. El porcentaje de células cTfh es significativamente menor en pacientes con ERC cuando se comparan con los controles sanos, individuos sanos no trasplantados, como se observa en la Figura 21A y 21B.

En la cohorte estudiada hay 145 hombres y 61 mujeres, sólo un tercio de la población estudiada son mujeres por lo que es interesante comprobar si hay diferencias en las poblaciones celulares analizadas por sexo. Como se observa en la Figura 21C, existen diferencias en cTfh entre hombres y mujeres. Así, con este análisis se encontró más cTfh en hombres que en mujeres.

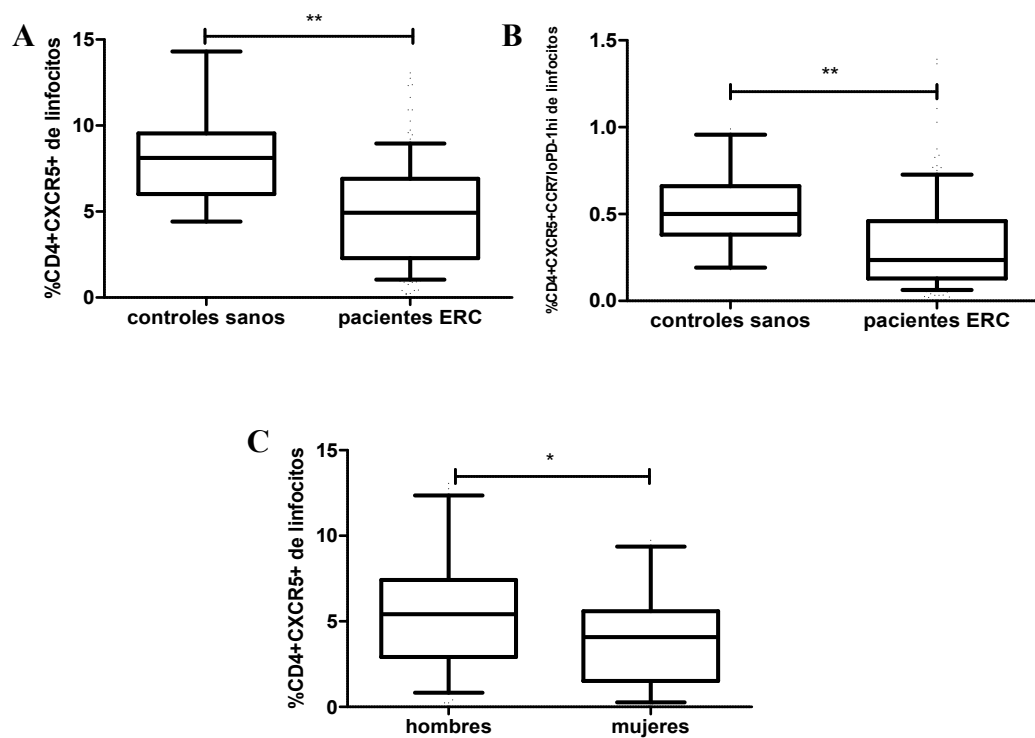


Figura 21. Diferencias encontradas entre pacientes con ERC y controles sanos y en función del sexo. A, Existen menos %CXCR5+ de linfocitos en los pacientes con ERC, n=154, preTx, si se comparan con individuos sanos, n=13, p=0,002. B, existen menos %CXCR5+CCR7loPD1hi de linfocitos en los pacientes con ERC, n=137, preTx, si se comparan con individuos sanos n=11, p=0,0029. C, se encontraron más %CXCR5+ de linfocitos en hombres, n=108, que en mujeres, n=46, p=0,0123.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número de células cTfh según enfermedad de base, ni función del injerto (inmediata versus retardada).

2.4. Efecto de la diálisis sobre los linfocitos cTfh

En los pacientes con ERC, se observa un menor porcentaje y de números absolutos de cTfh en pacientes en diálisis cuando se comparan con los pacientes que no han recibido tratamiento renal sustitutivo, como se observa en las Figuras 22A y 22B.

Existen diferencias en los linfocitos cTfh si se comparan entre los tipos de diálisis, como se aprecia en las Figuras 22C y 22D. Se observó más linfocitos cTfh en prediálisis, menos en diálisis peritoneal y menos aún en hemodiálisis.

Además, con este estudio se ha demostrado que cuanto más tiempo en diálisis menos cTfh se encuentran en los pacientes estudiados. El tiempo en diálisis parece correlacionar con una disminución gradual de células cTfh, Figuras 22E, 22F y 22G.

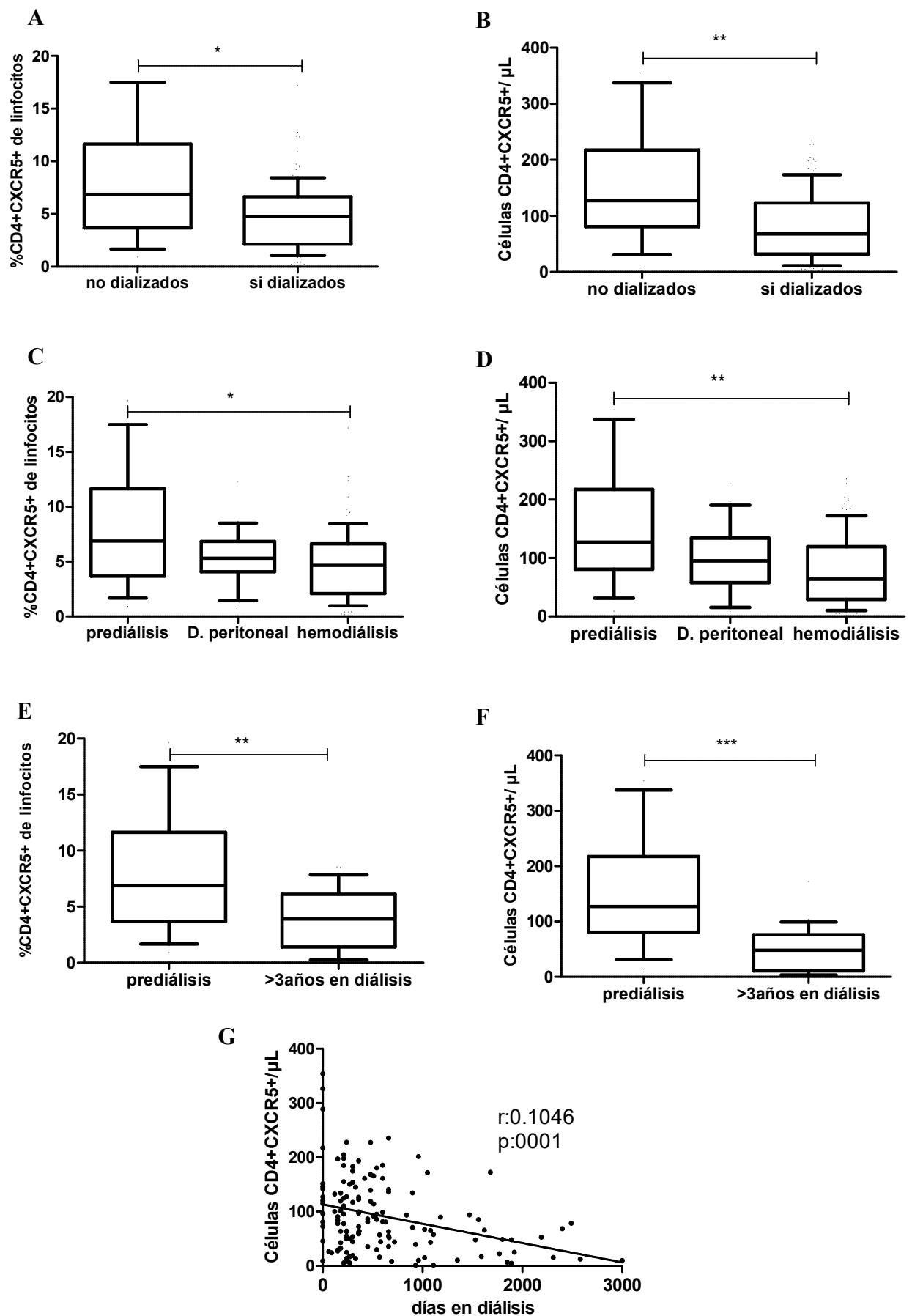


Figura 22. Efecto de la diálisis sobre los linfocitos cTfh. Ver página siguiente.

Pie de Figura 22, página anterior. Efecto de la diálisis sobre los linfocitos cTfh. A, se encontró más %CXCR5+ de linfocitos en no dializados, n=15, que en dializados n=137, p=0,0122. B, se encontró más números absolutos de CXCR5+ en no dializados n=15, que en dializados, n=134, p=0,0044. C, efecto del tipo de diálisis sobre %CXCR5+ de linfocitos en preTx. Prediálisis n=15, d.peritoneal n=23, HD n=114, p=0,0244. D, efecto del tipo de diálisis sobre el número absoluto de células CXCR5+ en preTx. Prediálisis n=15, d.peritoneal n=23, HD n=111, p=0,0049. E, diferencias encontradas en %CXCR5+ de linfocitos según tiempo en diálisis. Prediálisis n=15, >3años en diálisis n=24, p=0,0086. F, diferencias encontradas en números absolutos de células CXCR5+ según tiempo en diálisis. Prediálisis n=15, >3años en diálisis n=24, p=0,0002. G, Tiempo en diálisis. r=0,105, p<0,001

2.5. Exposición a aloantígenos y linfocitos cTfh

Se analizó la relación entre las cTfh y la exposición a aloantígenos en pacientes en la lista de espera de trasplante. Los pacientes que habían tenido que recibir transfusiones de sangre (39,9% en la cohorte estudiada), mostraron un incremento de las cTfh comparados con los pacientes que no han sido transfundidos (Figura 23A). En la cohorte estudiada, el 10,2% de los pacientes recibieron un segundo trasplante renal. El grupo que había recibido un trasplante previo, y por tanto había estado expuesto a aloantígenos del donante anterior, mostraron una mayor frecuencia de cTfh que los pacientes que no habían sido trasplantados con anterioridad (Figura 23B). Por lo tanto, en la cohorte estudiada, los pacientes que recibieron transfusiones o un trasplante previo mostraron un aumento en las cTfh.

Dado que la exposición a aloantígenos favorece la producción de anticuerpos antiHLA, a continuación nos preguntamos si, antes del trasplante, el aumento de cTfh pudiera estar relacionada con la sensibilización a los antígenos del HLA. Las células cTfh estaban incrementadas preTx en pacientes con antiHLA de clase I en comparación con pacientes no sensibilizados, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo (1,2% vs 0,8%, p=0,1). Debido a que las mujeres tienen menos cTfh que los hombres, y hay mayor proporción de mujeres dentro del grupo de pacientes sensibilizados (51,2% vs 24,5% en

no sensibilizados), se analizó por sexo la asociación entre las cTfh preTx y la sensibilización antiHLA. Se demostró que existe un mayor número de cTfh en mujeres con anticuerpos antiHLA de clase I que en mujeres no sensibilizadas y esta diferencia hizo estadísticamente significativa cuando se comparó la frecuencia de cTfh entre ambos grupos (Figura 23C). Lo que también se demostró es una correlación positiva entre las frecuencias de cTfh y los niveles de anticuerpos antiHLA de clase I (Figura 23D). Estos datos sugieren que existe un papel de las cTfh en la producción de anticuerpos antiHLA en pacientes con contacto previo a aloantígenos antes del trasplante. No se encontró asociación entre el desarrollo de anticuerpos antiHLA de clase II y cTfh, ni en números absolutos ni en porcentajes, ni analizando por separado las mujeres.

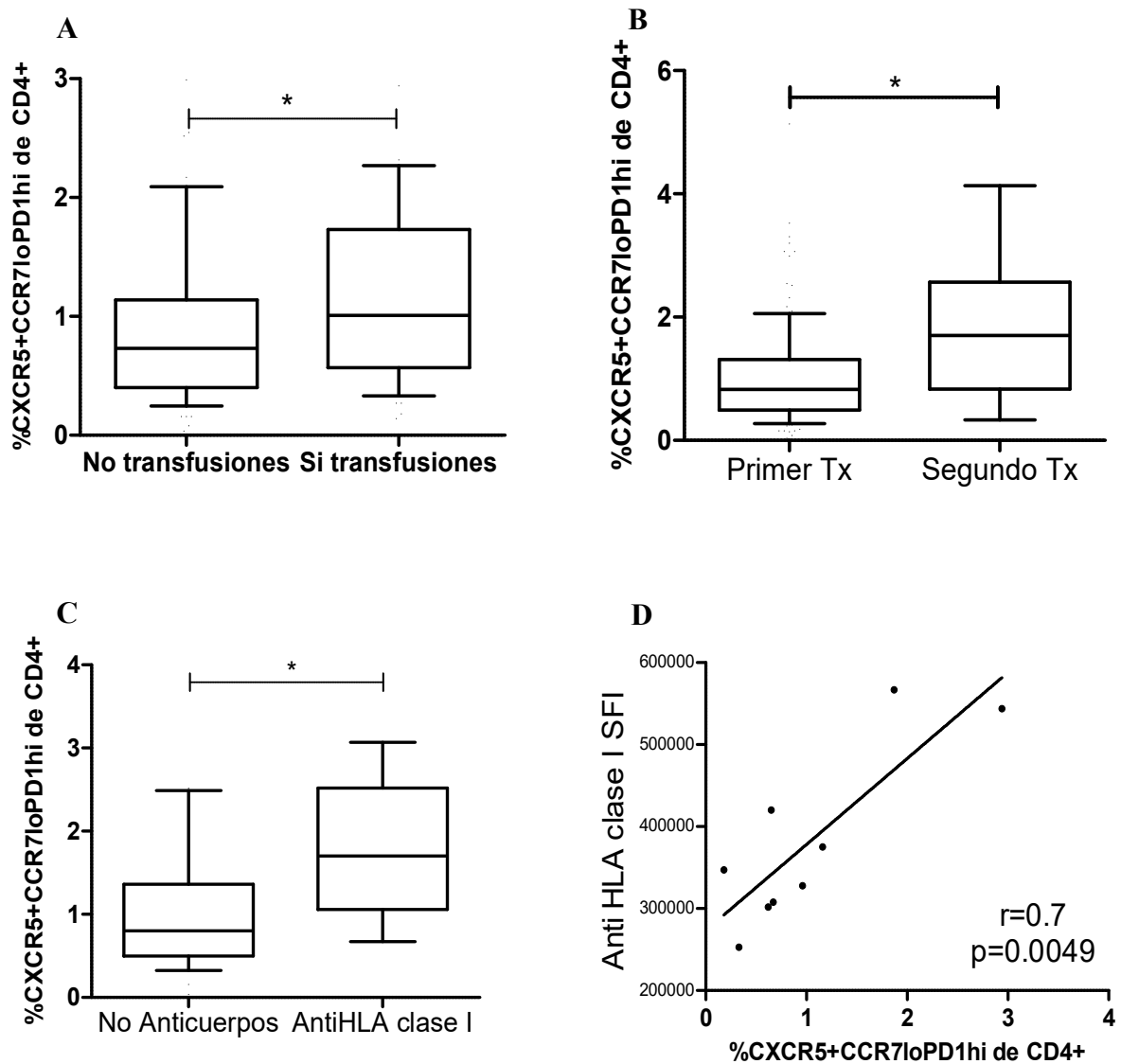


Figura 23. Análisis de cTfh en pacientes con exposición a aloantígenos y en pacientes sensibilizados frente a HLA. A, Existe más %CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4+ en pacientes que se transfundieron (n=53), que en personas sin transfusiones previas, n=65, p=0,0181. B, existen más %CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4+ en los que se van a trasplantar, n=9, que en los que se trata de su primer trasplante, n=126, p=0,0268. C, existen más %CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4+ en mujeres con anticuerpos antiHLA preTx, n=9, que en mujeres no sensibilizadas preTx, n=30, p=0,024. D, %CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4 preTx según SFI de anticuerpos antiHLA de clase I preTx, $r=0,7$; $p=0,005$.

2.6. Asociación entre cTfh preTx y eventos de naturaleza inmunológica postTx

En este apartado se van a exponer los resultados del análisis de la asociación de cTfh preTx y el desarrollo de anticuerpos antiHLA postTx, el desarrollo de DSA postTx y la aparición de rechazo.

Se analizó la relación entre las cTfh preTx y el desarrollo posterior de DSA postTx, que tendría sentido desde un punto de vista biológico. De los pacientes que desarrollaron DSA de novo en la cohorte estudiada, se dispuso de la medición preTx en 7 de ellos. No se encontró ninguna asociación entre los niveles de cTfh preTx y el desarrollo de DSA (Figura 24 C y D). Este resultado puede deberse al bajo número de pacientes que desarrollaron DSA durante el primer año de seguimiento. Sin embargo, se observó una correlación positiva entre la frecuencia de células cTfh preTx y la intensidad de anticuerpos antiHLA de novo de clase I y clase II postTx (Figura 24 A y B).

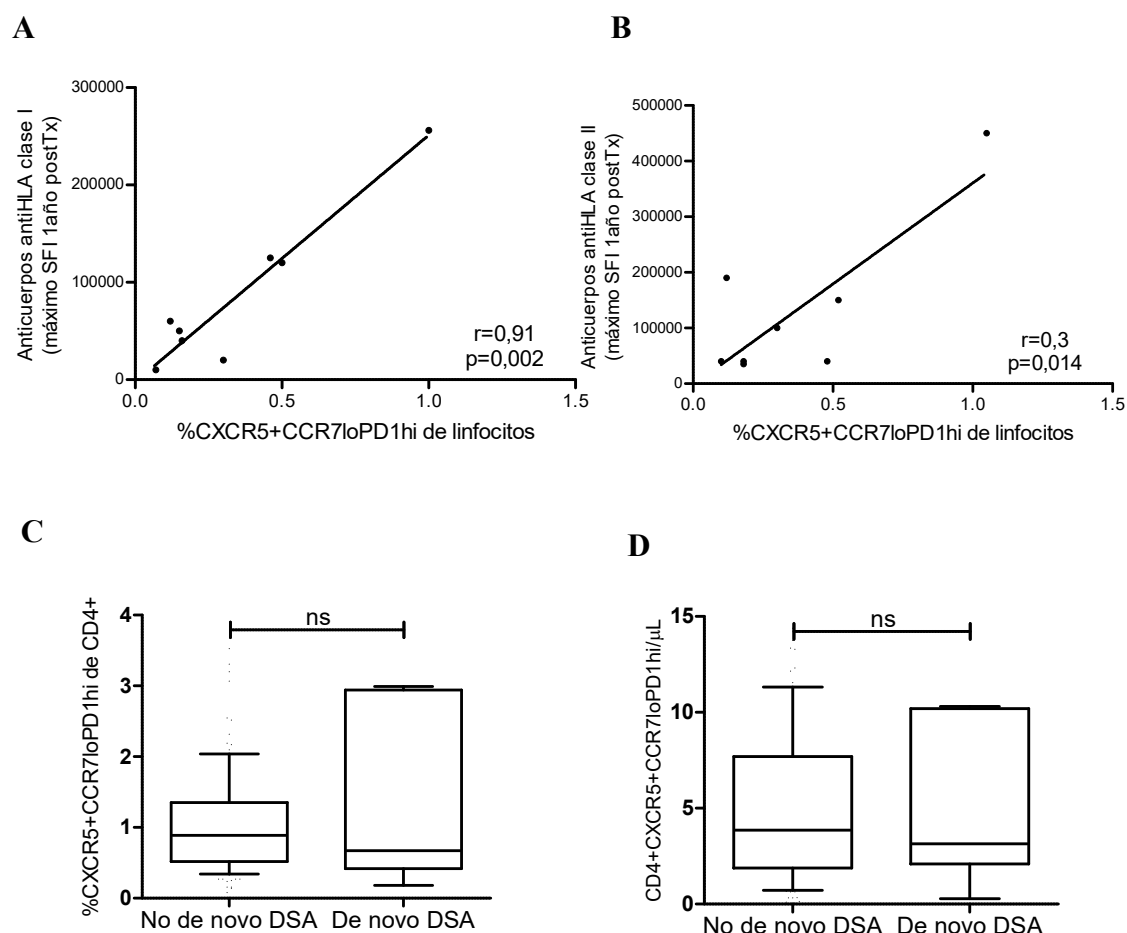


Figura 24. Relación entre cTfh preTx y anticuerpos antiHLA postTx. A, asociación entre %CXCR5+CCR7loPD1hi de linfocitos y señal de anticuerpos antiHLA de clase I postTx, $r=0,91$, $p=0,002$. B, asociación entre %CXCR5+CCR7loPD1hi de linfocitos y señal de anticuerpos antiHLA de clase II postTx, $r=0,3$, $p=0,014$. C y D, no se observaron diferencias en cTfh preTx según el desarrollo DSA postTx.

Con respecto al rechazo, se estudió la asociación entre las cTfh y el rechazo agudo ya que se conoce que los anticuerpos antiHLA aumentan el riesgo del rechazo y se había encontrado una relación entre el aumento de las cTfh preTx y la presencia de anticuerpos antiHLA preTx.

En la cohorte estudiada, 18 pacientes (8,7%) sufrieron BPAR. La cifra de cTfh preTx se asoció con el riesgo de BPAR ($HR=1.14$, $1,04-1,25$, $p<0,01$). Por tanto el rechazo es 1,14 veces más probable que ocurra por cada aumento de 1 célula cTfh por microlitro a nivel preTx (tabla 8). De los 18 eventos de rechazo agudo en la cohorte estudiada, 5 fueron

rechazos mediados por anticuerpos y 13 rechazos celulares. De los 5 pacientes con ABMR se dispone de la medición de cTfh preTx en 3 de ellos. De los 13 pacientes con rechazo celular, se dispone de la medición de cTfh pre Tx de 8 de ellos. La asociación con rechazo celular permaneció, pero no se encontró asociación entre cTfh y ABMR. La falta de asociación con ABMR fué posiblemente debida al bajo número de eventos.

Tabla 8. Asociación entre cTfh preTx y el riesgo de rechazo agudo postTx, analizando el rechazo global y estratificando por rechazo humoral o celular.

	Rechazo agudo		
	Pr>ChiSq	HR (95% CI)	
preTx cTfh	0.0031	1.14 (1.04-1.25)	Todos los rechazos
preTx cTfh	0.7489	0.95 (0.71-1.28)	Sólo los rechazos humorales
preTx cTfh	0.0004	1.18 (1.07-1.28)	Sólo los rechazos celulares

Este estudio se realizó en un solo centro, en una cohorte de pacientes. Para estudios de biomarcadores es importante validar los hallazgos. La alternativa a validar los datos en otro centro es utilizar un método estadístico de remuestreo para reanalizar los datos, por el que se subdivide de manera aleatoria el total de observaciones disponibles en un set de entrenamiento y un set de validación (168).

Por ello, se reanalizaron los datos para el estudio de asociación entre los niveles cTfh antes del trasplante y el riesgo de rechazo por validación cruzada. La cohorte total de pacientes se dividió en dos grupos: “development sample” o set de entrenamiento (60%) y “test sample” o set de validación (40%), de manera aleatoria con distribuciones equilibradas en los dos grupos.

En este análisis de validación cruzada (tabla 9), el hazard ratio permaneció significativo en la “development sample” pero no para el “test sample”. La limitación más probable

para alcanzar significación estadística es el bajo número de rechazos (n=18) y el hecho que las mediciones preTx de cTfh estén disponibles en sólo 11 de los pacientes.

Tabla 9. Reanálisis de la asociación obtenida entre cTfh preTx y rechazo agudo, aplicando un método de remuestreo con set de entrenamiento (development sample) y validación (test sample), en vez de utilizar la regresión de Cox en el total de la cohorte (original sample).

Hazard ratio in the original sample n = 135; event = 11		Hazard ratio in the development sample n = 81; event = 7		Re-estimated hazard ratio in the test sample; n = 54, event = 4	
HR, CI(95%)	p-value	HR, CI(95%)	p-value	HR, CI(95%)	p-value
1.14 (1.04- 1.25)	0.0031	1.18(1.05-1.31)	0.0047	1.09(0.95-1.26)	0.2134

2.7. Análisis de cTfh preTx y el posterior desarrollo de viremia por CMV

Además del rechazo del trasplante, los pacientes trasplantados sufren otras complicaciones que pueden derivar en la pérdida del injerto o en una peor calidad de vida. Destaca la infección por CMV, que se ve favorecida por el tratamiento inmunosupresor, y que afecta aproximadamente al 30% de los pacientes trasplantados renales (169)(170). Dada la función conocida de las Tfh en la respuesta inmune frente a infecciones se evaluó la relación entre cTfh preTx y la posterior aparición de infección por CMV en pacientes trasplantados renales. De la cohorte de pacientes estudiados se seleccionaron los pacientes que no recibieron profilaxis frente a CMV con valganciclovir (es decir, aquellos pacientes con serología positiva para CMV preTx y que no han sido tratados con timoglobulina). Se observó que los pacientes que postTx presentaron viremias negativas para CMV tenían las cTfh significativamente más altas preTx (Figura 25A) sugiriendo un posible papel protector de las cTfh frente a la infección por CMV. Además, se evaluó si había relación entre las cTfh preTx y el tiempo de demora hasta la aparición de la infección por CMV postTx. Se observó una correlación positiva entre las cTfh preTx y los días transcurridos hasta la aparición de viremia (Figura 25B).

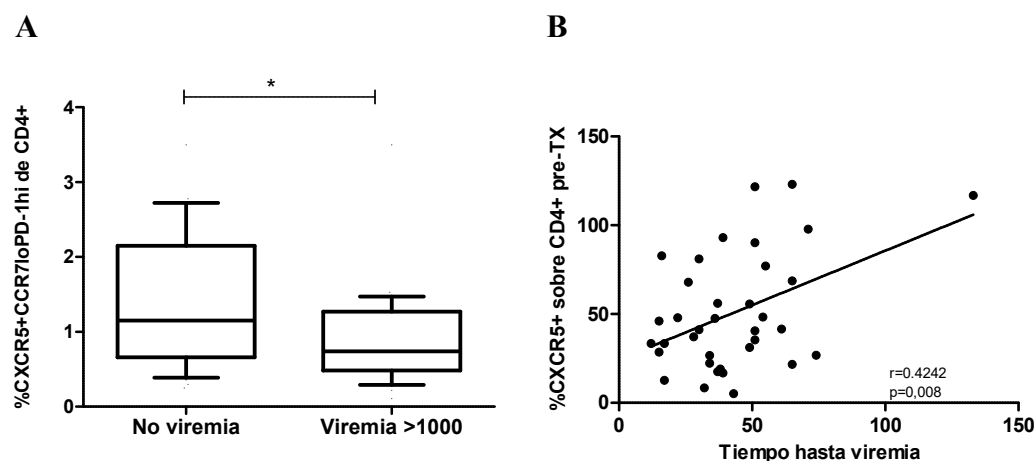


Figura 25. Relación cTfh preTx y viremia CMV postTx. A, El %CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4 preTx fue superior en los pacientes que no se infectaron por CMV postTx comparado con los pacientes que si desarrollaron viremia CMV postTx. No viremia n=31, viremia>1000 n=32, p=0,03). B, asociación entre %CXCR5+ de CD4+ y el tiempo hasta viremia postTx, r=0,42, p=0,008.

Por último, se analizó la asociación entre cTfh preTx y la probabilidad de desarrollar infección por CMV postTx mediante regresión de Cox, y se demostró que las cTfh altas preTx son un factor protector frente a infección por CMV [HR=0,90, IC95% (0,84-0,94), p=0,007]. Esto significa que por cada aumento del 1% en las cTfh preTx la probabilidad de tener infección por CMV postTx fué 1,11 veces menor.

3. EVOLUCIÓN Y SIGNIFICADO DE LAS cTFH POSTTRASPLANTE (postTX)

3.1. Demostración de la capacidad funcional de los linfocitos cTfh postTx

El desarrollo de anticuerpos antiHLA de novo postTx sugiere una actividad de las cTfh a pesar de la terapia de inmunosupresión de mantenimiento. Se midió la capacidad de las cTfh de pacientes trasplantados para cooperar en la diferenciación de las células B hacia plasmablastos in vitro. Las células CD4+CXCR5+ circulantes obtenidas de pacientes tras 6 meses de la cirugía del trasplante fueron capaces de inducir la diferenciación de los linfocitos B hacia plasmablastos, aunque de manera ligeramente inferior a las células CD4+CXCR5+ de los controles sanos (Figura 26A y 26C). Acorde con la diferenciación de plasmablastos, se detectó IgG en los cocultivos de pacientes, aunque menos que en los cultivos que se utilizaron células de controles ($p=0,021$) (Figura 26B). Esta reducción parcial en la capacidad de las cTfh de pacientes de promover la producción de anticuerpos podría deberse a la terapia inmunosupresora de mantenimiento que éstos reciben.

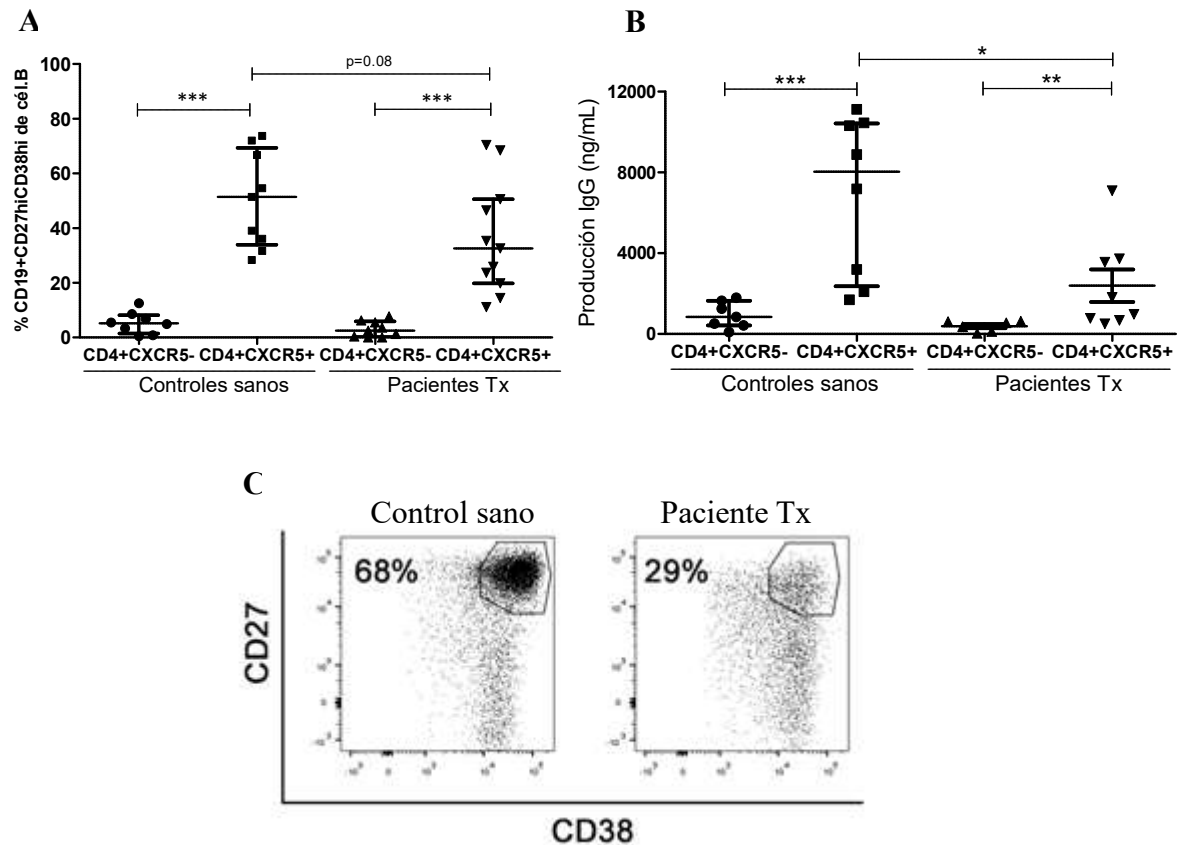


Figura 26. Producción de plasmablastos (CD19+CD27hiCD38hi) y producción de inmunoglobulinas en cocultivos de pacientes trasplantados a 6 meses postTx. A, la diferenciación de linfocitos B a plasmablastos fue muy superior en los cocultivos con células CD4+CXCR5+ que en los cocultivos con CD4+CXCR5-, tanto en controles sanos como en pacientes trasplantados. B, La producción de IgG fue también mayor en los cocultivos con CD4+CXCR5+ comparado con aquellos con CD4+CXCR5-, aunque las células de los pacientes produjeron menor cantidad de IgG que las de los controles sanos. C, ejemplo representativo de plasmablastos (CD19+CD27hiCD38hi) analizados por citometría en cocultivos de células B de memoria con células CD4+CXCR5+ de un control sano y un paciente a 6 meses postTx.

Además, se midió la cantidad de IgG en sangre de los pacientes a 1 mes postTx. Se dividió a los pacientes en función de si sus niveles de IgG en suero estaban dentro del rango de normalidad (700-1400mg/dL), por debajo (<700mg/dL) o por encima (>1400mg/dL). Se encontró que los pacientes que tenían los niveles de IgG más bajos, tenían menos cTfh (Figura 27). Este resultado es acorde con la función de las cTfh en la producción de IgG observada in vitro.

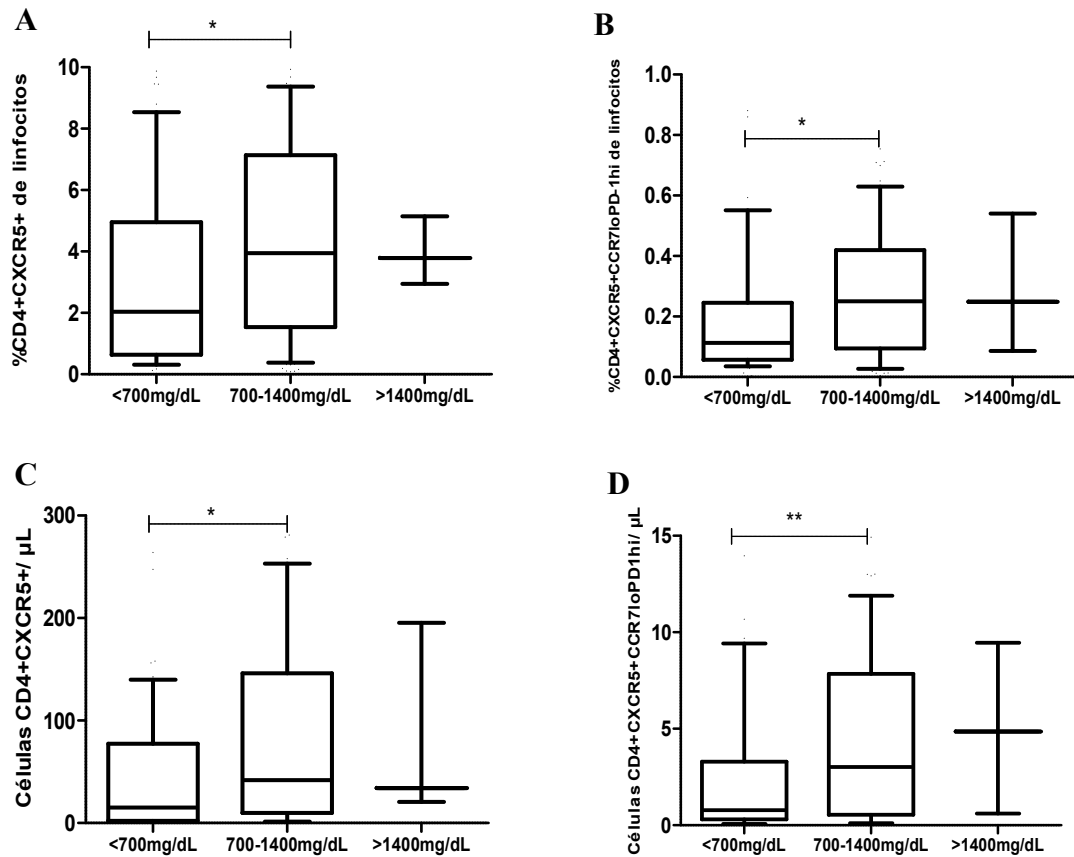


Figura 27. Relación cTfh e IgG medida en suero 1 mes postTx. A, %CD4+CXCR5+ de linfocitos a 1 mes postTx según niveles de Inmunoglobulina G en suero. <700 n=62, 700-1400 n=86, >1400 n=3, p<0,05. B, %CD4+CXCR5+CCR7loPD1hi de linfocitos a 1 mes postTx según niveles de Inmunoglobulina G en suero. <700 n=53, 700-1400 n=79, >1400 n=3, p<0,05. C, Células CD4+CXCR5+/μL a 1 mes postTx según niveles de Inmunoglobulina G en suero. <700 n=62, 700-1400 n=86, >1400 n=3, p<0,05. D, Células CD4+CXCR5+CCR7loPD1hi/μL a 1 mes postTx según niveles de Inmunoglobulina G en suero <700 n=53, 700-1400 n=79, >1400 n=3, p<0,05.

3.2. Evolución de cTfh durante el tiempo postTx

Durante el seguimiento postTx, las células cTfh aumentaron teniendo en cuenta el conjunto de todos los pacientes estudiados, como se observa en la Figura 28. En este apartado se muestran las gráficas resumen del seguimiento de las variables de citometría medidas en sangre periférica de los pacientes a lo largo del estudio.

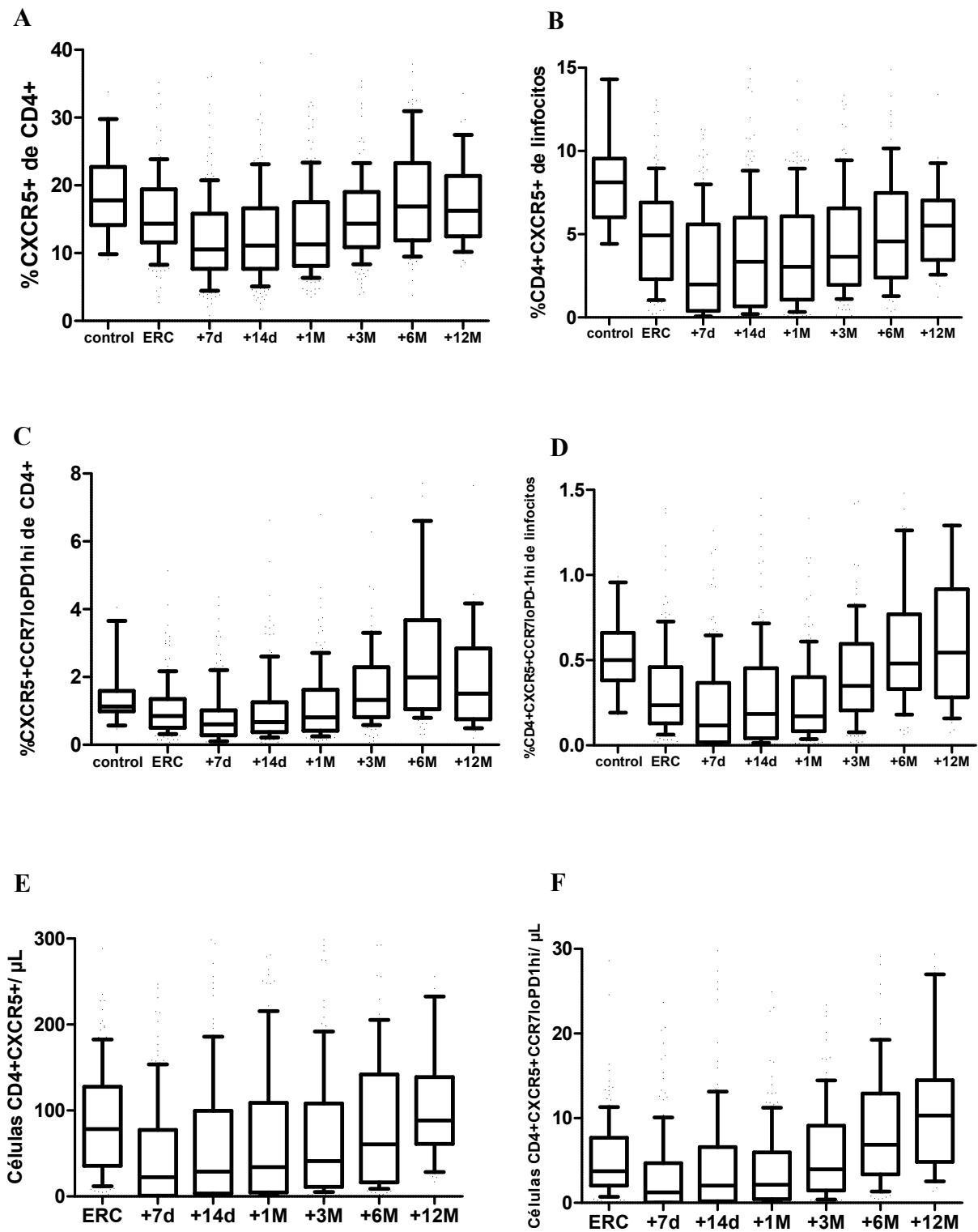


Figura 28. Evolución de las frecuencias y números absolutos de cTfh durante el tiempo de seguimiento.

3.3. Efecto de la terapia de inducción en las células cTfh

Cuando se analiza la cohorte según la terapia de inducción recibida, se observa que el perfil de cTfh postTx en los pacientes tratados con basiliximab es muy similar a los pacientes que no recibieron terapia de inducción. A los 6 meses postTx la cifra de cTfh en pacientes con basiliximab y en los pacientes sin inducción fueron el doble si las comparamos con niveles preTx (Figura 29). Por el contrario, en los pacientes tratados con timoglobulina existe una drástica reducción en los números de cTfh tras la administración de la terapia de inducción. La cifra de cTfh en los pacientes tratados con timoglobulina también aumenta tras el trasplante pero permanece más baja que los grupos tratados con basiliximab o sin inducción. Al mes 6 postTx la cifra de cTfh en los pacientes tratados con timoglobulina fueron similares a los niveles preTx. Por tanto, la terapia con timoglobulina elimina de manera drástica las cTfh, teniendo que pasar 6 meses para que estas células se recuperen, mientras que basiliximab no tiene este efecto deplecionante sobre las células cTfh.

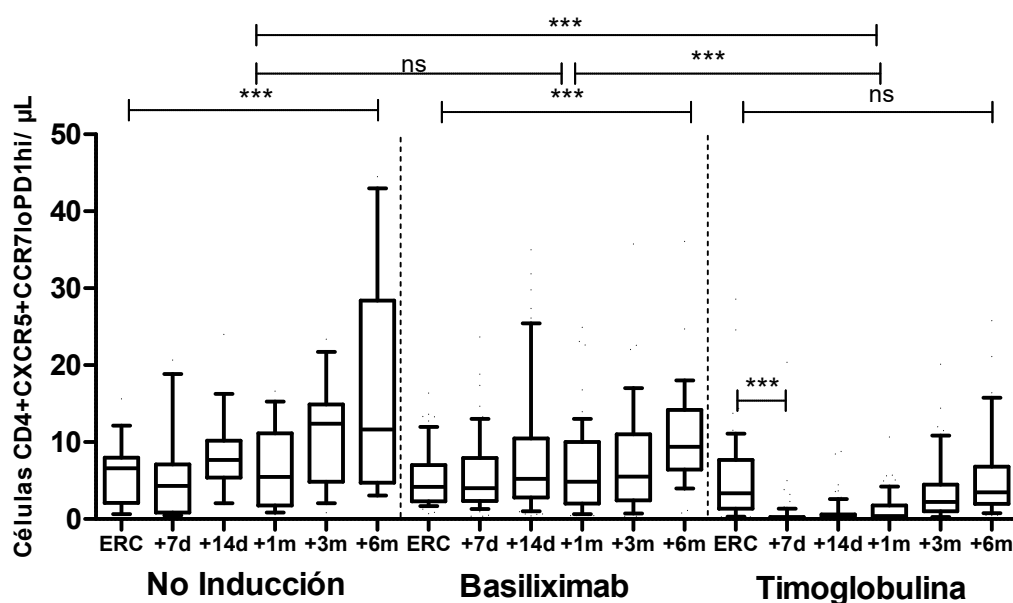


Figura 29. Números absolutos de CXCR5+CCR7loPD1hi/μL postTx según la terapia de inducción. No inducción n=23, Basiliximab n=83, Timoglobulina n=93.

3.4. Relación entre las células cTfh y el desarrollo de anticuerpos antiHLA postTx

Se analizaron las cTfh en pacientes que no estaban sensibilizados antes del Tx, es decir, que no tenían anticuerpos antiHLA preformados. Estos pacientes no sensibilizados se dividieron en dos grupos dependiendo de si durante el año de seguimiento postTx desarrollaron (-/+, 7%) o no (-/-, 93%) anticuerpos antiHLA de novo. Como ya se ha argumentado previamente, las cTfh aumentaron con el tiempo postTx (Figura 27). Sin embargo, como se observa en la Figura 30, los pacientes que desarrollaron anticuerpos antiHLA de novo mostraron una mayor expansión de las cTfh que los pacientes que se mantuvieron antiHLA negativos ($p<0,05$). Este resultado no fue debido a las diferencias en el tratamiento de inducción entre los grupos porque la proporción de pacientes con basiliximab y timoglobulina fue similar en ambos grupos (-/+ vs -/- $p=0,13$).

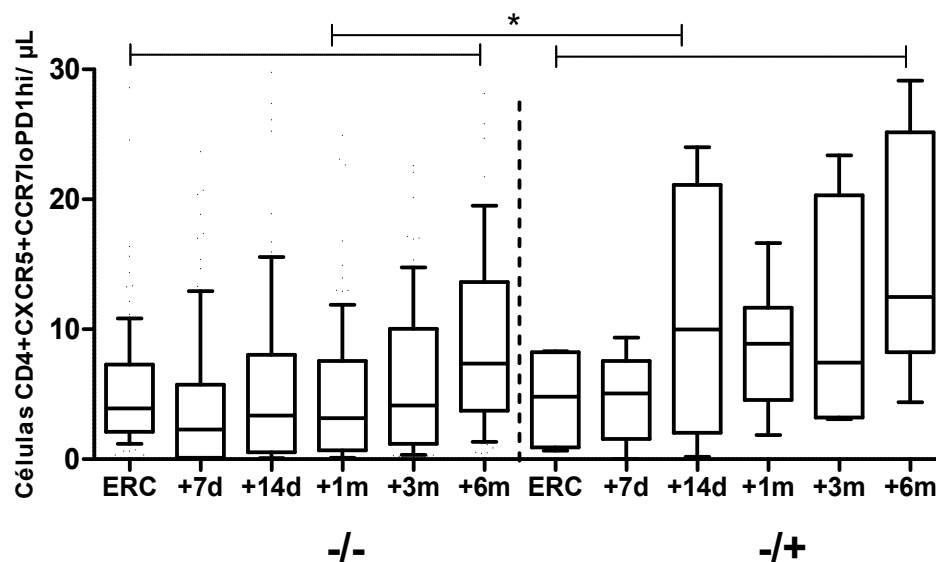


Figura 30. Evolución de las cTfh postTx en los pacientes que se sensibilizaron de novo frente a HLA y en los que no se sensibilizaron. Se observó que en los pacientes que desarrollaron anticuerpos antiHLA de novo (-/+) mostraron una mayor expansión de las cTfh que los pacientes que se mantuvieron antiHLA negativos (-/-) ($p<0,05$).

3.5. Estudio de las cTfh postTx en función de la serología CMV

Los pacientes y los donantes pueden clasificarse según su serología frente a CMV. Un paciente con serología positiva, con anticuerpos detectables frente a CMV, quiere decir que ha estado previamente en contacto con el virus, y que puede tener cierta protección frente a la infección por CMV. Un paciente con serología negativa significa que no ha estado en contacto con CMV previamente. En función del seroestatus para CMV del donante/receptor, se pueden distinguir 4 tipos de parejas: (+/+), (+/-), (-/+) y (-/-).

Si comparamos los pacientes con serología donante/receptor (+/+) vs. (+/-) se observa que en el grupo (+/-), en el cual se puede producir una primoinfección por CMV tras el trasplante, existen más cTfh a +7 días postTx, a +14 días postTx y a 1 mes postTx (Figura 31).

Esta expansión de las cTfh en los pacientes que entran en contacto con CMV por primera vez sugiere que las Tfh pueden tener una función en la respuesta inmune frente a CMV.

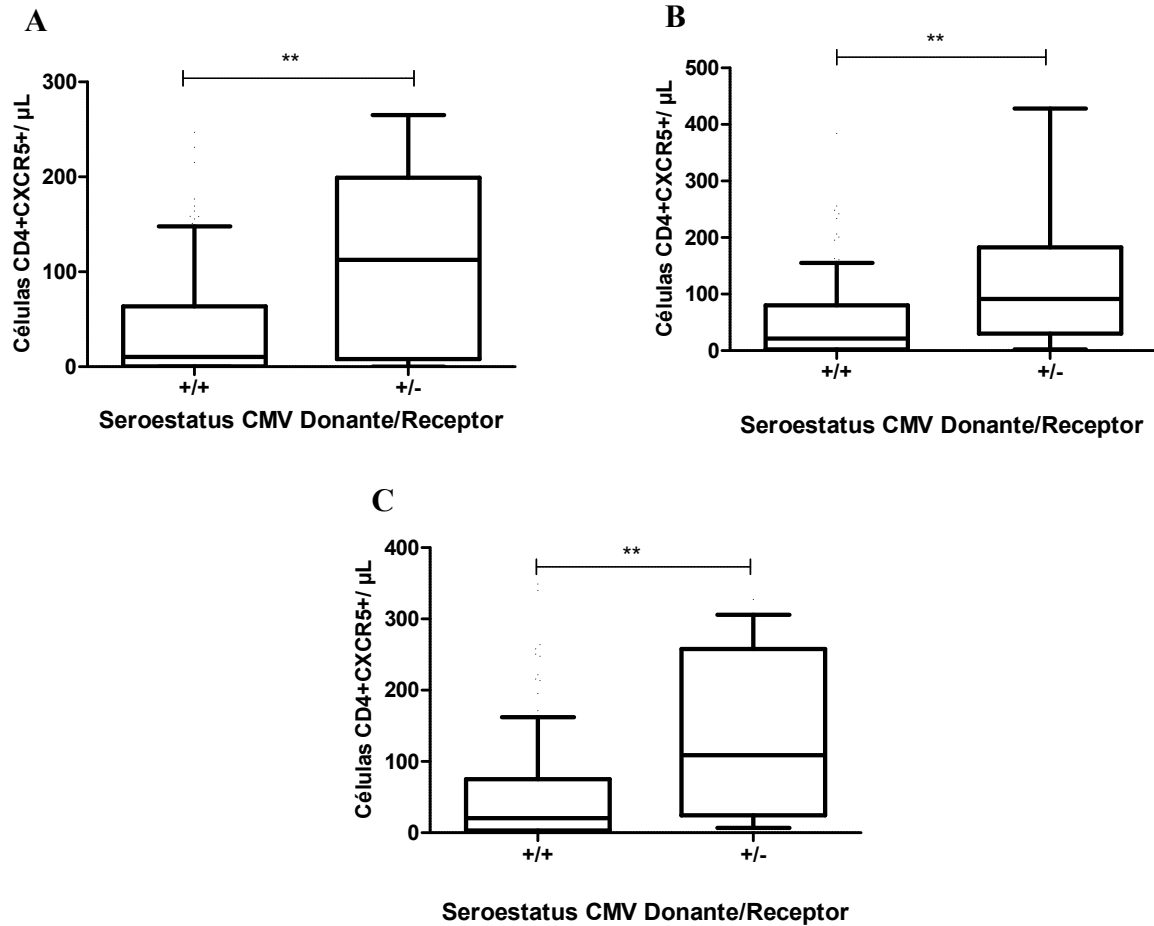


Figura 31. Células cTfh postTx y su relación con CMV. Las células cTfh se expanden a 7 y 14 días, y 1 mes postTx en los pacientes con serología negativa para CMV que reciben un riñón de un donante seropositivo. A, Células CXCR5+/ μ L a 7 días postTx según estatus serología CMV donante/receptor. +/+ n=120, +/- n=16, $p<0,01$. B, Células CXCR5+/ μ L a 14 días postTx según estatus serología CMV donante/receptor. +/+ n=114, +/- n=18, $p<0,01$. C, Células CXCR5+/ μ L a 1 Mes postTx según estatus serología CMV donante/receptor. +/+ n=116, +/- n=18, $p<0,01$.

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los linfocitos Tfh son necesarios para la producción de anticuerpos de alta afinidad. Las células Tfh cooperan para que los linfocitos B proliferen, se diferencien y maduren hacia células plasmáticas capaces de secretar anticuerpos. Las cTfh proceden de la migración de las Tfh de los órganos linfoides secundarios tras el contacto con las células dendríticas. Se piensa que en el trasplante de órgano sólido estas células circulantes Tfh son capaces de moverse a los tejidos diana y favorecer la producción de anticuerpos. Hay datos que demuestran que las Tfh y células B migran al injerto y participan en la producción de anticuerpos en un “órgano linfoide terciario” (145,171,172). Dado que estos anticuerpos están íntimamente relacionados con la posibilidad de rechazo del órgano trasplantado, y que su desarrollo parece depender estrechamente de las Tfh, estas células pueden ofrecer dianas terapéuticas potenciales en el tratamiento de ABMR (123).

Las células Tfh se han estudiado en mayor profundidad en campos como la autoinmunidad, vacunas e infecciones, donde se ha demostrado que son necesarias para la producción de anticuerpos. Con el descubrimiento de las cTfh, el análisis de las propiedades de las células Tfh se ha hecho más accesible. En esta tesis se confirmó que las células CD4+CXCR5+ representan, no sólo desde el punto de vista de su fenotipo, sino también por su funcionalidad, a las células Tfh de los órganos linfoides secundarios. Las células CD4+CXCR5+ favorecieron la diferenciación de las células B en plasmablastos capaces de secretar inmunoglobulinas, cosa que no ocurrió con las células CD4+ CXCR5-. El considerar que las células CD4+CXCR5+ en sangre periférica son homólogas o equivalentes a los linfocitos T cooperadores foliculares encontrados en los órganos linfoides secundarios es algo relativamente reciente (137,141). Las células cTfh no sólo tienen un fenotipo y producción de citoquinas similares a las Tfh de los órganos linfoides secundarios, sino que son capaces de dirigir la diferenciación de las células B

en células plasmáticas productoras de IgG in vitro. Las células cTfh han facilitado enormemente el estudio de las células Tfh en condiciones de salud y diferentes enfermedades, por su mayor accesibilidad.

Existe controversia para identificar el subgrupo dentro de las cTfh que se correlacione mejor con la respuesta mediada por anticuerpos. Las cTfh constituyen aproximadamente el 15% de las células T CD4⁺ de memoria en humanos (118,137-140). Estudios recientes han demostrado que las cTfh están compuestas de poblaciones celulares heterogéneas con diferentes fenotipos. Lo que más se conoce de las cTfh viene del campo de la autoinmunidad, de infecciosas y de la respuesta a vacunas. Así, la población PD1⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ se correlaciona con la respuesta de anticuerpos neutralizantes frente a HIV (135). La población ICOS⁺CXCR3⁺CXCR5⁺ correlaciona con la respuesta a la vacuna de la gripe (139). Con respecto a la autoinmunidad, se ha demostrado que las células CXCR5⁺CD4⁺ de sangre periférica comparten propiedades funcionales con las Tfh, y parecen representar un compartimento de memoria circulante. Los pacientes con dermatomiositis juvenil, una enfermedad autoinmune sistémica, presentan aumentadas estas células y esta desviación se correlaciona con la actividad de la enfermedad y la frecuencia de plasmablastos (137). Este estudio sugiere que una pérdida en el equilibrio de los subgrupos Tfh contribuye a la autoinmunidad. Además, el subgrupo de células Tfh circulantes CD4⁺CXCR5⁺CCR7^{lo}PD1^{hi} se ha demostrado que correlaciona con índices clínicos de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide o el lupus (141).

Además, se ha propuesto que la expresión de CXCR3, CCR6, CCR7, ICOS y PD1 definen subgrupos de Tfh con diferente capacidad para ayudar a los linfocitos B en la transformación hacia células que producen anticuerpos (133). Estos autores sostienen que las células Tfh forman un grupo heterogéneo basado en la expresión de los receptores de quimioquinas CXCR3 y CCR6: CXCR3⁺CCR6⁻ representan las células Tfh1, CXCR3⁻

CCR6- representan las células Tfh2, y CXCR3-CCR6+ representan las Tfh17. Estos subgrupos tienen distintas capacidades para ayudar a las células B, las Tfh2 y las Tfh17 promueven la diferenciación de las células B vía secreción de IL21, mientras que las células CXCR3+ Tfh1 son menos eficaces en esta función. Además, las células Tfh2 promueven particularmente la secreción IgG e IgE, mientras que las Tfh17 son más eficientes en promover la secreción IgG e IgA.

En resumen, desde el descubrimiento de las cTfh se han descrito muchos inmunofenotipos, pero es comúnmente aceptado que las células cTfh son células de memoria, expresan de manera constitutiva CXCR5, CD28 y CD40L en su superficie, y tras su activación sobreexpresan ICOS y PD1 y bajan la expresión de CCR7.

La controversia en la bibliografía con respecto al inmunofenotipo de los linfocitos cTfh nos llevó a medir las siguientes variables en sangre periférica de los pacientes trasplantados de riñón estudiados y considerarlas como cTfh: %CXCR5+ de CD4 y de linfocitos, %CXCR5+CCR7loPD1hi de CD4 y de linfocitos, números absolutos de CD4+CXCR5+/ μ L y CD4+CXCR5+CCR7loPD1hi/ μ L.

Está descrito en la literatura que los pacientes con ERC tienen células T prematuramente envejecidas (173). Este proceso es probablemente inducido por el ambiente proinflamatorio urémico creado por la pérdida de función renal (Figura 32). La pérdida de función renal está relacionada, entre otros factores, con la inmunodeficiencia asociada a la uremia, que contribuye significativamente a la mortalidad de los pacientes con ERC. Los cambios que se producen son: pérdida en número y función de linfocitos y expansión de la población de memoria, compatible con el concepto de envejecimiento prematuro del sistema inmunológico (174).

Los cambios en la composición de células T periféricas de los pacientes con ERC recuerdan a los cambios fisiológicos en el sistema inmune de las personas ancianas. Los estudios que han ahondado en el envejecimiento celular en pacientes con ERC han utilizado como referencia ancianos sanos y han demostrado una discrepancia de 15-20 años entre la edad cronológica e inmunológica de las células T de pacientes con ERC (173). El envejecimiento prematuro de las células T en los pacientes con ERC se asocia con una reducción en la respuesta a la vacunación y a un incremento en la susceptibilidad a infección (175).

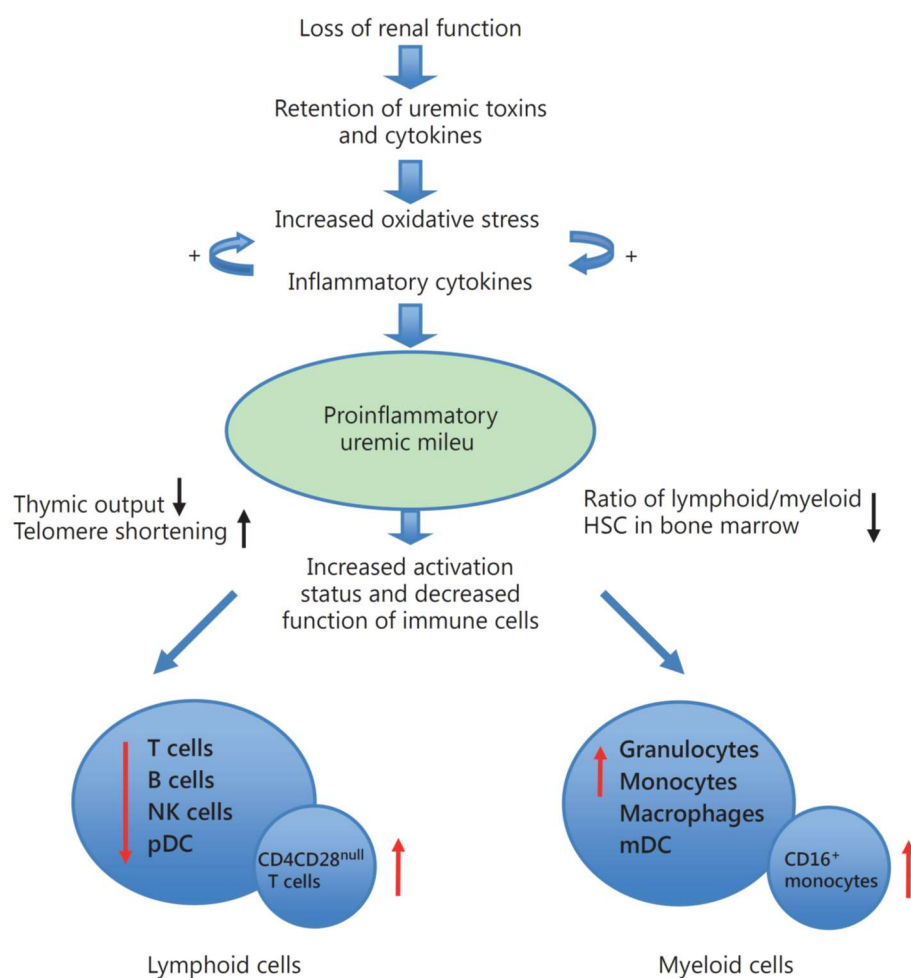


Figura 32. Efecto de la uremia sobre las principales poblaciones celulares sanguíneas. [Tomado de Betjes MGH. et al. 2013 (173)]

La uremia tiene un efecto diferente sobre las células linfoides y mieloides (Figura 31). Las células que pertenecen al linaje linfóide, como las células T, las células B y las células NK están disminuidas en número y en función. Esto puede ser causado por la combinación de un entorno proinflamatorio con stress oxidativo aumentado. Las células que pertenecen al linaje mielode, como los granulocitos o monocitos, pueden estar aumentadas en este estado urémico.

El aumento de la linfopenia se observa en relación con la pérdida de función renal. Esto se debe a una pérdida muy acusada de las células T naïve (176)(177)(178). En pacientes con ERC se observa un aumento en la incidencia de cáncer asociados a virus, tuberculosis, disminución de la respuesta a la vacunación de antígenos dependientes de células T, lo que sugiere un mayor peso de la deficiencia de las células T (174).

Teniendo esto en cuenta, sería posible que una pérdida progresiva de la función renal afectara a todos los componentes de la respuesta inmune adaptativa y pudiera explicar las observaciones clínicas.

En esta tesis se encontró un menor número de cTfh en pacientes con ERC en comparación con controles sanos. Los pacientes en la lista de espera de un trasplante renal presentan inmunodeficiencia asociada a la uremia y una función alterada de las células del sistema inmunológico. Así, los pacientes estudiados presentarían una cifra de linfocitos más baja de lo normal que podría explicar la disminución en números absolutos de cTfh. Sin embargo, también existe una reducción en el porcentaje de cTfh que significa que la subpoblación cTfh está más reducida que otros subgrupos dentro de la población linfocitaria. Este hallazgo sugiere que el ambiente proinflamatorio y el stress oxidativo asociado con la uremia afectaría preferentemente a las células T CD4+CXCR5+. Por otra parte, el pequeño porcentaje de pacientes con ERC que todavía no habían recibido tratamiento renal sustitutivo (prediálisis) presentaron una frecuencia de cTfh similar a

controles sanos. Esto respaldaría la posibilidad que el proceso de diálisis por sí mismo podría disminuir de manera selectiva las cTfh. De hecho, se encontró una disminución en cTfh que se correlacionó positivamente con el tiempo en diálisis. Aunque en este estudio se encontró que las cTfh de pacientes en diálisis mantuvieron su capacidad de diferenciar células B a plasmablastos, su capacidad de producción de IgG se mostró disminuida, sugiriendo que la uremia parcialmente afecte a la función de las cTfh.

Se observó un aumento gradual en las cTfh durante los 6 meses tras el trasplante que podría reflejar una recuperación del estado de uremia, debido al nuevo riñón funcionando, o por la recuperación del efecto deplecionante potencial de la diálisis. Con respecto a la función de estas células, a los 6 meses postTx se demostró que son funcionalmente activas aunque menos que las de los controles sanos.

Se conoce que las cTfh están aumentadas tras la vacunación o tras la infección. Por tanto, es razonable hipotetizar que la exposición previa a aloantígenos podría incrementar estas cTfh en pacientes en la lista de espera a trasplante. Los pacientes con un trasplante previo o que habían recibido transfusiones mostraron un aumento en cTfh antes del trasplante. La expansión de las cTfh en estos pacientes puede reflejar respuestas aloespecíficas no sólo frente a antígenos HLA sino también a antígenos de histocompatibilidad secundarios, o ser el resultado en parte de la respuesta frente a estímulos ambientales. Los pacientes con un trasplante previo están comúnmente infectados con CMV y *Candida albicans* y el 10% del repertorio de células T puede llegar a ser específico de estas infecciones (179). Se necesitarían estudios que analicen el repertorio TCR y, por tanto, la especificidad antigénica del receptor de la célula T, para determinar la composición de esta población cTfh expandida.

Otro aspecto que se tuvo en cuenta fue la presencia de anticuerpos antiHLA en pacientes en lista de espera. La exposición previa a aloantígenos es considerada un factor de riesgo

en el trasplante debido a la producción de anticuerpos antiHLA. La presencia de anticuerpos antiHLA correlaciona con un peor pronóstico del órgano trasplantado, especialmente si son donante específicos (DSA) (101,180,181). Los anticuerpos antiHLA considerados deletéreos son de tipo IgG. Esto quiere decir que son anticuerpos con cambio de clase y, por tanto, el linfocito B que los ha producido ha tenido que interaccionar necesariamente con una célula Tfh específica frente al mismo antígeno. En concreto, los anticuerpos de subclases IgG1 e IgG3 se asocian especialmente con una peor supervivencia del injerto, probablemente debido a su capacidad de unir el complemento (102).

La primera publicación que mostró una relación entre las células Tfh y el trasplante renal pertenece al grupo de Carla Baan en Rotterdam (143). Ellos no encontraron diferencias en el número de cTfh antes y después del trasplante en una cohorte de pacientes trasplantados de riñón, y mostraron que la capacidad de las cTfh en la producción de plasmablastos *in vitro* era parcialmente reducida después del trasplante y la capacidad de los linfocitos cTfh en la producción de anticuerpos IgG *in vitro* era similar antes y después del trasplante. Los pacientes con DSA preformados tuvieron unos números de cTfh más elevados postTx que los que no tenían DSA antes del trasplante. Cuando este grupo estudió las biopsias de los riñones diagnosticados como rechazo agudo mediado por células T, se identificaron estructuras similares a folículos terciarios con células que marcaban para CD3 y Bcl6 y se colocalizaban con las células B, lo que sugiere que las células Tfh están interaccionando con las células B en el órgano donde se produce el rechazo. En una publicación más reciente, el mismo grupo mostró que en un estudio *in vitro*, la diferenciación a plasmablastos y la producción de inmunoglobulinas eran dependientes de la IL21 producida por las cTfh (127).

En esta tesis se analizó la relación entre cTfh y la sensibilización antiHLA en una cohorte prospectiva con 206 trasplantados renales. Los pacientes con trasplantes previos o transfusiones sanguíneas tienen cifras de cTfh antes del trasplante aumentadas, lo que sugiere que las células cTfh aumentan con la exposición a aloantígenos. Se encontró que los pacientes con anticuerpos antiHLA preformados antes del trasplante tienen más cTfh que los pacientes no sensibilizados, aunque esta diferencia solo fue significativa en las pacientes mujeres con anticuerpos antiHLA de clase I. No se demostró una asociación estadísticamente significativa entre las células cTfh y la presencia de anticuerpos en trasplantados varones ni en pacientes con anticuerpos antiHLA de clase II, probablemente debido al bajo número de sujetos en estos subgrupos dentro de la cohorte de pacientes. Además, en los pacientes previamente sensibilizados se observó que existe una correlación positiva entre los niveles de cTfh antes del trasplante y los títulos de anticuerpos antiHLA preTx.

Los trabajos de Chenouard et al. (146) y Macedo et al. (182) también han estudiado el desarrollo de anticuerpos antiHLA en el trasplante renal, en dos situaciones distintas. En el primero, se demuestra que en pacientes tolerantes operacionales, que son aquellos pacientes trasplantados que sin inmunosupresión no rechazan el órgano trasplantado, existe un perfil transcriptómico de las cTfh muy diferente si se compara con pacientes estables bajo terapia de inmunosupresión, no produciendo IL21 ni manteniendo la producción de IgG in vitro. Además los niveles de cTfh fueron más altos en pacientes estables que posteriormente desarrollaron DSA de novo. La incapacidad funcional de las cTfh de estos pacientes tolerantes, junto con la baja incidencia de anticuerpos DSA, apoya la hipótesis de que una posible diana para reducir el riesgo de desarrollar anticuerpos antiHLA serían las células Tfh. En el estudio de Macedo et al. se ha demostrado que en pacientes que desarrollan DSA postTx, existe un alto porcentaje de cTfh y un porcentaje

disminuido de células T reguladoras (Treg), lo que resulta en un ratio incrementado de cTfh:Treg y en la producción de DSA (182). Además, la mitad de los pacientes que desarrollaron anticuerpos antiHLA de novo tenían previamente células cTfh IL21+ reactivas frente al donante.

Basándose en la expansión de las cTfh en infecciones virales crónicas, es lógico pensar que el contacto permanente con antígenos del trasplante pudiera estimular la expansión de las cTfh postTx y traducirse en una producción de aloanticuerpos. De hecho, los pacientes trasplantados que desarrollaron anticuerpos anti HLA de novo tuvieron más cTfh postTx. Un hallazgo similar se publicó por el grupo de Chenouard et al (146), que publicaron la existencia de un aumento de cTfh al año postTx en pacientes que posteriormente desarrollaron de novo DSA. En nuestra cohorte, no se observó una asociación entre cTfh y DSA, dado que el número de pacientes que desarrollaron DSA de novo fue muy bajo (16 pacientes desarrollaron DSA y solo tuvimos mediciones de cTfh preTx de 7 de ellos).

En relación con el rechazo del injerto, el rechazo mediado por células T es la causa más común de la disfunción del órgano el primer año del trasplante, sin embargo, después el rechazo mediado por anticuerpos se convierte en la causa más común, siendo responsable de dos terceras partes de las pérdidas del riñón trasplantado (86).

En esta tesis se encontró que la elevación en el número de cTfh antes del trasplante es un factor de riesgo para el rechazo agudo del órgano trasplantado, con un hazard ratio significativo de 1,14. Por tanto, es la primera vez que se demuestra que los niveles elevados de cTfh son un factor de riesgo para el rechazo agudo en el trasplante renal. La interacción entre cTfh y las células B tiene como resultado la diferenciación hacia plasmablastos y la producción de anticuerpos que de manera plausible desencadenarían el ABMR.

Apoyando este último resultado, el grupo de Rotterdam ha demostrado la presencia de Tfh en las biopsias de rechazo renal agudo (143). La presencia de Tfh y de estructuras linfoides “ectópicas” a modo de órganos linfoides “terciarios” dentro de las biopsias de riñones en rechazo sugieren un mecanismo de activación de células B en el mismo órgano trasplantado durante el rechazo mediado por linfocitos T. Además, estos autores explican esta asociación de Tfh y rechazo agudo, no sólo con la producción de anticuerpos, sino con la secreción por parte de las Tfh de IL21 que podría regular positivamente la producción de granzima B en las células T CD8, favoreciendo su capacidad citotóxica y desencadenando el rechazo mediado por linfocitos T (183). Esto podría explicar también que al realizar la regresión de Cox para el análisis de asociación entre cTfh y rechazo, y estratificando por tipo de rechazo, el HR saliera significativo teniendo en cuenta exclusivamente los rechazos agudos mediados por células T. En este contexto, las cTfh altas preTx podrían favorecer la capacidad citotóxica de los linfocitos CD8 mediante la secreción de IL21, favoreciendo el rechazo celular.

De manera similar al rechazo agudo, hay datos que muestran una asociación entre las Tfh y el rechazo crónico del órgano trasplantado. En un estudio reciente, las células cTfh productoras de IL21 estaban incrementadas, mientras que las células Tfr estaban disminuidas en sangre de pacientes trasplantados de riñón con biopsias que demostraban un rechazo crónico mediado por anticuerpos (132). Similar a estos resultados, hay otro estudio con una pequeña cohorte de pacientes trasplantados de riñón en los que las cTfh estaban incrementadas en pacientes con rechazo crónico del riñón comparados con pacientes estables (184).

También se estudió el efecto de la terapia de inmunosupresión y las células cTfh. Las terapias de inmunosupresión actuales han sido desarrolladas principalmente para prevenir la activación, proliferación y función de los linfocitos T efectores. El hecho que el daño

crónico del injerto termine sucediendo, principalmente debido al aloreconocimiento humoral, indica que los fármacos inmunosupresores actuales podrían no ser completamente eficientes en limitar la función de las células Tfh.

Timoglobulina es un anticuerpo policlonal comúnmente usado en la terapia de inducción en pacientes con alto riesgo inmunológico. En esta tesis se encontró que la timoglobulina reduce drásticamente los linfocitos cTfh de manera temprana en el postTx y se tarda 6 meses en recuperar los niveles de cTfh de antes del trasplante. En una cohorte diferente, las células cTfh también estaban deplecionadas tras la inducción con timoglobulina, sin embargo, estos autores observaron un aumento en la expresión de PD1, sugiriendo que las cTfh podrían activarse tras este tratamiento (182). Se necesitan más estudios clínicos para valorar el efecto del tratamiento con timoglobulina y su relación con la formación de anticuerpos DSA.

Basiliximab, un anticuerpo no deplecionante anti CD25, bloquea el receptor de la IL2 y es también usado frecuentemente en el tratamiento de inducción. En la cohorte estudiada, los niveles de cTfh de los pacientes tratados con basiliximab permanecieron similares a los niveles de los pacientes que no recibieron tratamiento de inducción. Basiliximab, no solo no tuvo el efecto deplecionante de timoglobulina, si no que los pacientes tratados con basiliximab mostraron un aumento de cTfh tras el trasplante y de esta forma, a los 6 meses postTx los pacientes tratados con basiliximab mostraron el doble de cTfh que antes del trasplante.

Se conoce que la IL2, STAT5 y Blimp1 colaboran negativamente en la diferenciación de las células Tfh (185,186). Por lo tanto, bloquear el receptor de la IL2 podría promover la diferenciación Tfh y la utilidad del basiliximab impidiendo la respuesta humoral podría ser limitada. Estos hallazgos podrían ser clínicamente relevantes debido a que el basiliximab que frecuentemente se utiliza para reducir los eventos adversos

inmunológicos, podría no tener el efecto inmunomodulador deseado sobre las Tfh. Debido a que las células Tfh son probablemente un componente esencial en la respuesta humoral hacia el órgano trasplantado, los pacientes tratados con basiliximab podrían encontrarse en un mayor riesgo de rechazo y la utilización de antagonistas del receptor de la IL2 podría no añadir beneficio a la terapia de inmunosupresión en pacientes con riesgo moderado de rechazo. Se requieren más estudios para evaluar los efectos del basiliximab sobre las células Tfh y su utilidad para evitar la alorespuesta humoral frente al órgano trasplantado.

Con respecto a las terapias de inmunosupresión de mantenimiento, el tacrolimus podría en teoría inhibir las células Tfh debido a que inhibe a NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) y los linfocitos Tfh dependen de esta vía de señalización. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los pacientes trasplantados reciben tacrolimus, la formación de anticuerpos antiHLA DSA y los episodios de rechazo siguen ocurriendo lo que sugiere que el tacrolimus no es totalmente efectivo. Los estudios sobre el efecto de la terapia de inmunosupresión crónica en las células cTfh son contradictorios (187). Lo que está claro es que hacen falta nuevas herramientas terapéuticas para mejorar la supervivencia a largo plazo del órgano trasplantado y que el conocimiento de los mecanismos subyacentes de la inmunidad mediada por Tfh puede dar lugar a nuevas dianas para explotar nuevas terapias.

Otro aspecto investigado en esta tesis fue la relación entre cTfh de los pacientes trasplantados y la infección por CMV. El CMV pertenece a la familia de los herpesvirus y tras la infección, se hace latente y sobrevive en las células hematopoyéticas y endoteliales (188). La infección por CMV se asocia con cambios importantes en las células T circulantes, y se estima que de media el 10% de ellas son específicas para CMV (189) (normalmente, <0,1% de las células T son antígeno específicas para un patógeno

determinado). La infección del CMV en individuos sanos y en ERC no sólo incrementa la diferenciación de células T CD4 y CD8 sino que también disminuye la longitud telomérica e induce un estado proinflamatorio. En la latencia del CMV, se disminuye el repertorio TCR Vbeta como consecuencia de una expansión importante de células T específicas frente a CMV (179). Por tanto, la infección por CMV tiene un impacto importante en la composición y función de células T circulantes, efectos que son en parte similares a los que se producen durante el envejecimiento inmunológico.

En esta tesis se observó que en los pacientes donde existe más riesgo de producirse la infección por CMV, demostrada por serología frente a este virus, las células cTfh aumentan tras la exposición. En aquellos pacientes que tenían una serología negativa frente al virus CMV antes del trasplante y que han sido trasplantados con un donante con serología positiva para CMV se considera que se puede producir una primoinfección por contacto con el virus del donante. Así, se observó que tras la exposición al CMV, la población de cTfh aumenta postTx en aquellos pacientes que sufren una infección por primera vez con el CMV. Esta observación concuerda con la idea de que el contacto previo con un antígeno extraño expande la población Tfh, como ya se había observado en la literatura y como también se comprobó en esta tesis en el caso de los sujetos en lista de espera que ya habían sido trasplantados con anterioridad o que habían recibido transfusiones.

Además, en este estudio se observó que los pacientes que no desarrollaron viremias CMV en el postTx, tenían cTfh más altas preTx. También se observó que existía una correlación positiva entre las cTfh preTx y los días hasta la aparición de viremia y que las cTfh altas preTx son un factor protector frente a infección por CMV.

Históricamente se ha considerado que la inmunidad que confieren las células NK y la inmunidad celular mediada por linfocitos T CD8+ (citotóxicos) es la más importante para

la defensa frente a infección por CMV (190)(191). Sin embargo, existe un porcentaje de receptores de trasplante renal con una aparentemente inmunidad celular protectora frente a CMV, que acaban desarrollando enfermedad por CMV (192,193). Esta observación, junto con los resultados de este trabajo, sugieren que en la defensa frente a CMV la inmunidad humoral también pueda ser necesaria, o que pueda complementar a la inmunidad celular, y de ahí la relevancia de explorar más a fondo esta relación entre Tfh, producción de anticuerpos antiCMV y desarrollo de infección/enfermedad por CMV postTx.

Como se ha visto, la regulación del sistema inmunológico es fundamental ante cualquier respuesta inmune para asegurar que es apropiada frente a la amenaza percibida por el organismo. En relación con el trasplante de órganos, es esencial controlar la respuesta innata desencadenada por el tejido dañado y la adaptativa estimulada por la incompatibilidad donante receptor en los antígenos de histocompatibilidad para hacer que el órgano trasplantado funcione y sobreviva a largo plazo.

La regulación inmunológica es un proceso complejo en el que intervienen múltiples mecanismos y cooperan poblaciones celulares distintas. El trasplante no es una excepción a esta regla y muchas poblaciones celulares pueden tener diferentes funciones en la respuesta inmunológica frente al órgano trasplantado.

Aunque las poblaciones leucocitarias, incluyendo macrófagos, células dendríticas, células B y células T pueden participar en la destrucción del órgano trasplantado, pueden también promover una respuesta tolerogénica y la supervivencia a largo plazo del órgano. Las células inmunes regulatorias son poblaciones leucocitarias especializadas que son seleccionadas durante su desarrollo o que adquieren propiedades inmunomoduladoras en el microambiente del injerto o de los tejidos linfoides adyacentes. La presencia de células inmunomoduladoras puede cambiar el resultado de la respuesta inmunológica hacia la

supervivencia o rechazo del órgano. Por tanto, estas células juegan un papel fundamental en el resultado a largo plazo en el trasplante.

Los pacientes trasplantados son tratados de rutina con inmunosupresores, alguno de los cuales pueden inhibir la generación o función de las células reguladoras del sistema inmunológico, entre las que se encuentran las Tfr. Aunque no han sido objeto de análisis en este trabajo, entender el impacto de los fármacos inmunosupresores en la función y generación de estas células es un paso importante para el éxito en la traslación clínica de nuevas terapias para mejorar los resultados a largo plazo en el trasplante y en particular el problema no resuelto del rechazo mediado por anticuerpos.

Para concluir, y resumiendo los resultados obtenidos en este trabajo, los pacientes trasplantados renales con cTfh elevadas es mas probable que presenten anticuerpos antiHLA preTx, que desarrollen anticuerpos antiHLA de novo postTx, y que sean más propensos al rechazo del órgano trasplantado.

Aunque estos hallazgos son interesantes, hay que tomarlos con cautela porque deben de ser validados en otros estudios multicéntricos ya que vienen de una única cohorte de un único centro. Si se confirmaran, las cTfh podrían ser usadas como biomarcador para el manejo de pacientes trasplantados y para el uso de fármacos inmunosupresores dirigidos frente a cTfh que podrían prevenir las respuestas humorales y mejorar el resultado del trasplante.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las células CD3+CD4+CXCR5+ circulantes en sangre son capaces de estimular la diferenciación de los linfocitos B a plasmablastos y la producción de IgG. Por tanto estas células representan funcionalmente a las Tfh de los órganos linfoides secundarios y pueden ser llamadas Tfh circulantes. Se ha demostrado la función de las cTfh en los pacientes con ERC antes del trasplante y 6 meses después del trasplante en pacientes con tratamiento inmunosupresor de mantenimiento.
2. Las células cTfh están disminuidas en pacientes con ERC y en pacientes que reciben diálisis. El porcentaje de células cTfh es significativamente menor en pacientes con ERC cuando se comparan con los controles sanos no trasplantados. Entre los pacientes con ERC, se observa un menor porcentaje y de números absolutos de cTfh en pacientes en diálisis cuando se comparan con los pacientes que no han recibido tratamiento renal sustitutivo. Además, el tiempo en diálisis correlaciona con una disminución gradual de células cTfh.
3. Las células cTfh están aumentadas en pacientes con ERC que han estado expuestos a aloantígenos, como es el caso de transfusiones de sangre y retrasplante.
4. Existe una relación entre aloanticuerpos y Tfh, evidenciándose que antes del trasplante los pacientes con anticuerpos antiHLA presentan más cTfh que los pacientes no sensibilizados. Después del trasplante se ha demostrado una expansión de cTfh en los pacientes que han desarrollado anticuerpos antiHLA de novo. Además, la cantidad de cTfh preTx se correlaciona directamente con la cantidad de anticuerpos antiHLA de clase I presentes en el suero de los pacientes antes del trasplante , y con la cantidad de anticuerpos antiHLA de clase I y II desarrollados de novo postTx.

5. La cifra de cTfh antes del trasplante se ha asociado con el riesgo de BPAR. El aumento de cTfh antes del trasplante se asocia con un aumento del riesgo de sufrir rechazo agudo del injerto renal durante el primer año después del trasplante.
6. Los tratamientos de inducción tienen diferentes efectos sobre las células cTfh. Timoglobulina es muy eficaz eliminando las células cTfh en los primeros meses después del trasplante. Por el contrario, basiliximab no tiene efecto sobre el número de cTfh, hecho que debería tenerse en cuenta en la elección de la inmunosupresión en pacientes con riesgo de ABMR.
7. Existe una relación entre cTfh y la infección por citomegalovirus. Las cTfh altas preTx protegen frente al desarrollo de infección por CMV postTx. Además, se observó que en los pacientes con serología negativa para CMV que entran en contacto con el virus por ser su donante positivo para CMV, las cTfh se expanden en el postTx inmediato.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol*.1998; 9(11):2135–41.
2. Suthanthiran M, Strom TB. Renal transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(6):365–76.
3. Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *JAMA* 1993;270(11):1339–43.
4. Bello AK, Johnson DW, Feehally J, Harris D, Jindal K, Lunney M, et al. Global Kidney Health Atlas (GKHA): design and methods. *Kidney Int Suppl [Internet]*. 2017;7(2):145–53.
5. La Enfermedad Renal Crónica en España 2018. Documento consenso 2018. Sociedad Española de Nefrología. www.senefro.org
6. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F, EPIRCE Study Group. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrologia*. 2010;30(1):78–86.
7. Guallar-castillón P, Álvaro F De, Rodríguez-artalejo F. Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrología*. 2018;38(6):606–15.
8. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad. Documento de trabajo sobre Enfermedad Renal Crónica 2015.

http://www.mscbs.gob.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/Enfermedad_Renal_Cronica_2015.pdf

9. Willis K, Cheung M, Slifer S. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for Evaluation & Management of CKD. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1).
10. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, et al. Documento de la sociedad española de nefrología sobre las guías KDIGO para la evaluación y el tratamiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrologia.* 2014;34(3):302–16.
11. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. Special Issue: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Am J Transplant.* 2009;9:S1–155.
12. Singhal R, Hux JE, Alibhai SMH, Oliver MJ. Inadequate predialysis care and mortality after initiation of renal replacement therapy. *Kidney Int.* 2014;86(2):399–406.
13. Heaf JG, Løkkegaard H, Madsen M. Initial survival advantage of peritoneal dialysis relative to haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17(1):112–7.
14. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, O'Dea R, Murray DC, et al. Mode of dialysis therapy and mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(2):267–76.
15. Brennan DC, Miller BW. Dialysis issues prior to and after renal transplantation. UpToDate. <https://www.uptodate.com> (Accessed 2018)
16. Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Waiting time on dialysis as the strongest modifiable risk factor for renal transplant outcomes: A paired donor kidney analysis. *Transplantation.* 2002;74(10):1377–81.

17. Goldfarb-Rumyantzev A, Hurdle JF, Scandling J, Wang Z, Baird B, Barenbaum L, et al. Duration of end-stage renal disease and kidney transplant outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(1):167–75.
18. Wong G, Turner RM, Chapman JR, Howell M, Lim WH, Webster AC, et al. Time on Dialysis and Cancer Risk After Kidney Transplantation. *Transplant J*. 2013;95(1):114–21.
19. Yeung MY. Overview of care of the adult kidney transplant recipient. UpToDate <https://www.uptodate.com> (Accessed 2018)
20. Briggs JD. Causes of death after renal transplantation. 2001; *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16: 1545-1549
21. Fishman JA. Infection in Solid-Organ Transplant Recipients. *N Engl J Med* 2007;357:2601-14
22. Woodward RS, Schnitzler MA, Lowell JA, Lopez-rocafort L. Incidence and Cost of New Onset Diabetes Mellitus Among U.S . Wait-Listed and Transplanted Renal Allograft Recipients. *American Journal of Transplantation* 2003;3: 590–598
23. Vajdic CM, McDonald SP, McCreddie MRE, Leeuwen MT Van, Stewart JH, Law M, et al. Cancer Incidence Before and After Kidney Transplantation. 2006;296(23):2823–31.
24. Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE, Brown RS, Danovitch GM, Gaston RS, et al. Recommendations for the Outpatient Surveillance of Renal Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11: S1–S86

- 25.** EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 4:1–67.
- 26.** Au E, Wong G, Chapman JR. Cancer in kidney transplant recipients. *Nat Rev Nephrol*. 2018;10–2.
- 27.** Chon WJ. Evaluation and diagnosis of the patient with renal allograft dysfunction. UpToDate. <https://www.uptodate.com> (Accessed 2018)
- 28.** Amer H, Cosio FG. Significance and Management of Proteinuria in Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20: 2490–2492
- 29.** Knoll GA. Proteinuria in Kidney Transplant Recipients: Prevalence, Prognosis, and Evidence-Based Management. *American Journal of Kidney Diseases* 2009;54(6):1131–44.
- 30.** Loupy A, Haas M, Solez K, Racusen L, Glotz D, Seron D, et al. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 2017;17(1):28–41.
- 31.** McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2000;69(3):319–26.
- 32.** Lionaki S, Panagiotellis K, Iniotaki A, Boletis JN. Incidence and clinical significance of de novo donor specific antibodies after kidney transplantation. *Clin Dev Immunol*. 2013
- 33.** Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, et al. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation*. 2002;74(8):1192–4.

- 34.** Tait BD, Süsal C, Gebel HM, Nickerson PW, Zachary AA, Claas FHJ, et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and Non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation*. 2013;95(1):19–47.
- 35.** Vella J. Transplantation immunobiology. UpToDate. <https://www.uptodate.com> (Accessed 2018)
- 36.** Sherman LA, Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol*. 1993;11(1):385–402.
- 37.** Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate Immunity and Organ Transplantation: The Potential Role of Toll-like Receptors. *Am J Transplant*. 2005;5(5):969–75.
- 38.** Murphy SP, Porrett PM, Turka LA. Innate immunity in transplant tolerance and rejection. *Immunol Rev*. 2011;241(1):39–48.
- 39.** Lanier LL. Nk Cell Recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(1):225–74.
- 40.** Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the Kidney Allograft. Schwartz RS, editor. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1451–62.
- 41.** Sacks SH, Zhou W. The role of complement in the early immune response to transplantation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(6):431–42.
- 42.** Medawar PB. The technique of free skin grafting in mammals. *Journal of Experimental Biology* 1951;28: 385-402
- 43.** Klein J, Sato A. The HLA System. Mackay IR, Rosen FS, editors. *N Engl J Med* 2000;343(10):702–9.

- 44.** Klein J, Sato A. The HLA System. Mackay IR, Rosen FS, editors. N Engl J Med. 2000;343(11):782–6.
- 45.** Molina J, Navas A, Agüera ML, Rodríguez Benot A. Avances en inmunología del trasplante renal. Nefrología. 2018;10(2):11–9.
- 46.** Liu Z, Colovai AI, Tugulea S, Reed EF, Fisher PE, Mancini D, et al. Indirect Recognition of Donor HLA-DR Peptides in Organ Allograft Rejection. The American Society for Clinical Investigation 1996;98(5):1150–1157
- 47.** Opelz G. Correlation of HLA matching with kidney graft survival in patients with or without cyclosporine treatment. Transplantation. 1985;40(3):240–3.
- 48.** Gilks WR, Bradley BA, Gore SM, Klouda PT. Substantial benefits of tissue matching in renal transplantation. Transplantation 1987;43(5):669–74.
- 49.** Williams RC, Opelz G, McGarvey CJ, Weil EJ, Chakkera HA. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. Transplantation. 2016;100(5):1094–102.
- 50.** Doxiadis IIN, Smits JMA, Schreuder GMT, Persijn GG, Houwelingen HC Van, Rood JJ Van, et al. Association between specific HLA combinations and probability of kidney allograft loss : the taboo concept. Lancet. 1996;348:850–3.
- 51.** Rees L, Kim JJ. HLA sensitisation: can it be prevented? Pediatr Nephrol. 2015;30(4):577–87.
- 52.** Terasaki PI, Cai J. Humoral theory of transplantation: Further evidence. Curr Opin Immunol. 2005;17(5):541–5.
- 53.** Mehra NK, Baranwal AK. Clinical and immunological relevance of antibodies in solid organ transplantation. Int J Immunogenet. 2016;43(6):351–68.

54. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, Drachenberg CB, Haas M, Nickleleit V, et al. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int.* 2012;81(7):628–39.
55. Baldwin WM, Valujskikh A, Fairchild RL. Mechanisms of antibody-mediated acute and chronic rejection of kidney allografts. *Curr Opin Organ Transplant.* 2016;21(1):7–14.
56. Akiyoshi T, Hirohashi T, Alessandrini A, Chase CM, Farkash EA, Neal Smith R, et al. Role of complement and NK cells in antibody mediated rejection. *Hum Immunol.* 2012;73(12):1226–32.
57. Starzl TE. Personal reflections in transplantation. *Surg Clin North Am.* 1978;58(5):879–93.
58. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation : Where are we now and where are we going ? *Transplant Rev.* 2019;31(1):10–7.
59. Hardinger KL, Brennan DC, Klein CL. Selection of induction therapy in kidney transplantation. *Transpl Int.* 2013;26(7):662–72.
60. Brennan DC. Induction immunosuppressive therapy in renal transplantation in adults. UpToDate. <https://www.uptodate.com> (Accessed 2018)
61. Szczech LA, Feldman HI. Effect of anti-lymphocyte antibody induction therapy on renal allograft survival. *Ann Intern Med.* 1998;128:817-82
62. Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med.* 2006;355(19):1967–77.
63. Brennan DC, Schnitzler MA. Long-term results of rabbit antithymocyte globulin and basiliximab induction. *N Engl J Med.* 2008;359(16):1736–8.

- 64.** Nashan B, Moore R, Amlot P, Schmidt A-G, Abeywickrama K, Souillou J-P. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. *Lancet*. 1997;350(9086):1193–8.
- 65.** Brokhof MM, Sollinger HW, Hager DR, Muth BL, Pirsch JD, Fernandez LA, et al. Antithymocyte globulin is associated with a lower incidence of de novo donor-specific antibodies in moderately sensitized renal transplant recipients. *Transplantation*. 2014;97(6):612–7.
- 66.** Chisholm MA. Issues of adherence to immunosuppressant therapy after solid-organ transplantation. *Drugs*. 2002;62(4):567–75.
- 67.** Greenstein S, Siegal B. Compliance and noncompliance in patients with a functioning renal transplant: a multicenter study. *Transplantation*. 1998;66(12):1718–26.
- 68.** Pinsky BW, Takemoto SK, Lentine KL, Burroughs TE, Schnitzler MA, Salvalaggio PR. Transplant outcomes and economic costs associated with patient noncompliance to immunosuppression. *Am J Transplant*. 2009;9(11):2597–606.
- 69.** Gore JL, Pham PT, Danovitch GM, Wilkinson AH, Rosenthal JT, Lipshutz GS, et al. Obesity and outcome following renal transplantation. *Am J Transplant*. 2006;6(2):357–63.
- 70.** Quiroga I, McShane P, Koo DDH, Gray D, Friend PJ, Fuggle S, et al. Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(6):1689–96.
- 71.** Narayanan M, Pankewycz O, El-Ghoroury M, Shihab F, Wiland A, McCague K, et al. Outcomes in African American kidney transplant patients receiving tacrolimus and mycophenolic acid immunosuppression. *Transplantation*. 2013;95(4):566–72.

72. Jacobson PA, Oetting WS, Brearley AM, Leduc R, Guan W, Schladt D, et al. Novel polymorphisms associated with tacrolimus trough concentrations: Results from a multicenter kidney transplant consortium. *Transplantation*. 2011;91(3):300–8.
73. Fidler S, Swaminathan R, Lim W, Ferrari P, Witt C, Christiansen FT, et al. Peri-operative third party red blood cell transfusion in renal transplantation and the risk of antibody-mediated rejection and graft loss. *Transpl Immunol*. 2013;29(1–4):22–7.
74. Pratschke J, Dragun D, Hauser IA, Horn S, Mueller TF, Schemmer P, et al. Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation. *Transplant Rev*. 2016;30(2):77–84.
75. Hönger G, Fornaro I, Granado C, Tiercy JM, Hösli I, Schaub S. Frequency and determinants of pregnancy-induced child-specific sensitization. *Am J Transplant*. 2013;13(3):746–53.
76. Higgins R, Lowe D, Daga S, Hathaway M, Williams C, Lam FT, et al. Pregnancy-induced HLA antibodies respond more vigorously after renal transplantation than antibodies induced by prior transplantation. *Hum Immunol*. 2015;76(8):546–52.
77. Otten HG, Verhaar MC, Borst HPE, Hené RJ, Zuilen AD Van. Pretransplant donor-specific HLA class-I and -II antibodies are associated with an increased risk for kidney graft failure. *Am J Transplant*. 2012;12(6):1618–23.
78. Opelz G, Döhler B. Ceppellini Lecture 2012: Collateral damage from HLA mismatching in kidney transplantation. *Tissue Antigens*. 2013;82(4):235–42.
79. Dunn TB, Noreen H, Gillingham K, Maurer D, Ozturk OG, Pruett TL, et al. Revisiting traditional risk factors for rejection and graft loss after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2011;11(10):2132–43.

- 80.** Cole EH, Johnston O, Rose CL, Gill JS. Impact of acute rejection and new-onset diabetes on long-term transplant graft and patient survival. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):814–21.
- 81.** Øien CM, Reisæter AV, Leivestad T, Dekker FW, Line PD, Os I. Living donor kidney transplantation: the effects of donor age and gender on short- and long-term outcomes. *Transplantation.* 2007;83(5):600–6.
- 82.** Crespo E, Lucia M, Cruzado JM, Luque S, Melilli E, Manonelles A, et al. Pre-transplant donor-specific T-cell alloreactivity is strongly associated with early acute cellular rejection in kidney transplant recipients not receiving T-cell depleting induction therapy. *PLoS One.* 2015;10(2):1–14.
- 83.** Foster BJ, Dahhou M, Zhang X, Platt RW, Smith JM, Hanley JA. Impact of HLA mismatch at first kidney transplant on lifetime with graft function in young recipients. *Am J Transplant.* 2014;14(4):876–85.
- 84.** Brennan DC. HLA and ABO sensitization and desensitization in renal transplantation. UpToDate. <https://www.uptodate.com> (Accessed 2018)
- 85.** Morath C, Zeier M, Döhler B, Opelz G, Süsal C. ABO-Incompatible Kidney Transplantation. *Front Immunol.* 2017;8:234.
- 86.** Sellarés J, de Freitas DG, Mengel M, Reeve J, Einecke G, Sis B, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant.* 2012;12(2):388–99.
- 87.** Loupy A, Lefaucheur C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med.* 2018;379(12):1150–60.

- 88.** Delville M, Lamarthée B, Pagie S, See SB, Rabant M, Burger C, et al. Early Acute Microvascular Kidney Transplant Rejection in the Absence of Anti-HLA Antibodies Is Associated with Preformed IgG Antibodies against Diverse Glomerular Endothelial Cell Antigens. *J Am Soc Nephrol.* 2019; 30: 692–709
- 89.** Sánchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Castillo-Rama M, Morales P, Lora-Pablos D, Valero-Hervás D, et al. Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period. *Transplant J.* 2013;96(1):70–8.
- 90.** Sánchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Mancebo E, Morales P, Laguna-Goya R, Morales JM, et al. Early renal graft function deterioration in recipients with preformed anti-MICA antibodies: partial contribution of complement-dependent cytotoxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(1):150–60.
- 91.** Sánchez-Zapardiel E, Mancebo E, Díaz-Ordoñez M, de Jorge-Huerta L, Ruiz-Martínez L, Serrano A, et al. Isolated De Novo Antiendothelial Cell Antibodies and Kidney Transplant Rejection. *Am J Kidney Dis.* 2016;68(6):933–43.
- 92.** Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet.* 1966;288(7465):662–5.
- 93.** Mehra NK, Siddiqui J, Baranwal A, Goswami S, Kaur G. Clinical relevance of antibody development in renal transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1283(1):30–42.
- 94.** Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med.* 1969;280(14):735–9.
- 95.** Tait BD. Detection of HLA antibodies in organ transplant recipients - triumphs and challenges of the solid phase bead assay. *Front Immunol.* 2016;7:570.

- 96.** Jordan SC, Reinsmoen N, Lai C-H, Vo A. Novel immunotherapeutic approaches to improve rates and outcomes of transplantation in sensitized renal allograft recipients. *Discov Med.* 2012;13(70):235–45.
- 97.** Amico P, Hirt-Minkowski P, Hönger G, Gürke L, Mihatsch MJ, Steiger J, et al. Risk stratification by the virtual crossmatch: A prospective study in 233 renal transplantations. *Transpl Int.* 2011;24(6):560–9.
- 98.** Mazuecos A, Alvarez A, Nieto A, Gentil MA, Cabello M, Rodriguez-Benot A, et al. Kidney Transplantation Results in Very Highly Sensitized Patients Included in a Virtual Crossmatch Program: Analysis of Kidney Pairs. *Transplant Proc.* 2016;48(9):2899–902.
- 99.** Valentin MO, Ruiz JC, Vega R, Martín C, Matesanz R, Gimeno Lozano JJ, et al. Implementation of a National Priority Allocation System for Hypersensitized Patients in Spain, Based on Virtual Crossmatch: Initial Results. *Transplant Proc.* 2016;48(9):2871–5.
- 100.** Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-specific antibodies adversely affect kidney allograft outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(12):2061–71.
- 101.** Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, Andrade J, Nochy D, Antoine C, et al. Preexisting Donor-Specific HLA Antibodies Predict Outcome in Kidney Transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1398–406.
- 102.** Lefaucheur C, Viglietti D, Bentelejewski C, Duong van Huyen J-P, Vernerey D, Aubert O, et al. IgG Donor-Specific Anti-Human HLA Antibody Subclasses and Kidney Allograft Antibody-Mediated Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):293–304.

- 103.** Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, Leffell MS, King KE, Burdick J, et al. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation*. 2000;70(6):887–95.
- 104.** Rocha PN, Butterly DW, Greenberg A, Reddan DN, Tuttle-Newhall J, Collins BH, et al. Beneficial effect of plasmapheresis and intravenous immunoglobulin on renal allograft survival of patients with acute humoral rejection. *Transplantation*. 2003;75(9):1490–5.
- 105.** Böhmig GA, Wahrmann M, Regele H, Exner M, Robl B, Derfler K, et al. Immunoabsorption in Severe C4d-Positive Acute Kidney Allograft Rejection: A Randomized Controlled Trial. *Am J Transplant*. 2007;7(1):117–21.
- 106.** Lefaucheur C, Nochy D, Andrade J, Verine J, Gautreau C, Charron D, et al. Comparison of combination Plasmapheresis/IVIg/anti-CD20 versus high-dose IVIg in the treatment of antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2009;9(5):1099–107.
- 107.** Sautenet B, Blancho G, Büchler M, Morelon E, Toupance O, Barrou B, et al. One-year Results of the Effects of Rituximab on Acute Antibody-Mediated Rejection in Renal Transplantation: RITUX ERAH, a Multicenter Double-blind Randomized Placebo-controlled Trial. *Transplantation*. 2016;100(2):391–9.
- 108.** Eskandary F, Regele H, Baumann L, Bond G, Kozakowski N, Wahrmann M, et al. A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(2):591–605.
- 109.** Stegall MD, Diwan T, Raghavaiah S, Cornell LD, Burns J, Dean PG, et al. Terminal complement inhibition decreases antibody-mediated rejection in sensitized renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2011;11(11):2405–13.

- 110.** Cornell LD, Schinstock CA, Gandhi MJ, Kremers WK, Stegall MD. Positive Crossmatch Kidney Transplant Recipients Treated With Eculizumab: Outcomes Beyond 1 Year. *Am J Transplant.* 2015;15(5):1293–302.
- 111.** Choi J, Aubert O, Vo A, Loupy A, Haas M, Puliyananda D, et al. Assessment of Tocilizumab (Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal) as a Potential Treatment for Chronic Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy in HLA-Sensitized Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant.* 2017;17(9):2381–9.
- 112.** Cruzado JM, Bestard O, Grinyó JM. Control of anti-donor antibody production post-transplantation: conventional and novel immunosuppressive therapies. *Contrib.Nephrol.* 2009;162:117–28.
- 113.** Viglietti D, Loupy A, Aubert O, Bestard O, Van Huyen J-PD, Taupin J, et al. Dynamic Prognostic Score to Predict Kidney Allograft Survival in Patients with Antibody-Mediated Rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(2):606–19.
- 114.** King C, Tangye SG, Mackay CR. T Follicular Helper (TFH) Cells in Normal and Dysregulated Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 2008;26(1):741–66.
- 115.** Claman HN, Chaperon EA, Triplett RF. Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1966;122(4):1167–71.
- 116.** Miller JFAP, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response: hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med.* 1968;128(4):801–20.
- 117.** Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell.* 1996;87(6):1037–47.

- 118.** Förster R, Emrich T, Kremmer E, Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood*. 1994;84(3):830–40.
- 119.** Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999;99(1):23–33.
- 120.** Qin L, Waseem TC, Sahoo A, Bieerkehazhi S, Zhou H, Galkina E V., et al. Insights Into the Molecular Mechanisms of T Follicular Helper-Mediated Immunity and Pathology. *Front Immunol*. 2018;9(8):1–21.
- 121.** Wali S, Sahoo A, Puri S, Alekseev A, Nurieva R. Insights into the development and regulation of T follicular helper cells. *Cytokine*. 2016;87:9–19.
- 122.** Choi YS, Gullicksrud JA, Xing S, Zeng Z, Shan Q, Li F, et al. LEF-1 and TCF-1 orchestrate TFH differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nat Immunol*. 2015;16(9):980–90.
- 123.** Yan L, de Leur K, Hendriks RW, van der Laan LJW, Shi Y, Wang L, et al. T Follicular Helper Cells As a New Target for Immunosuppressive Therapies. *Front Immunol* [Internet]. 2017;8(11):1–11.
- 124.** Locci M, Wu JE, Arumemi F, Mikulski Z, Dahlberg C, Miller AT, et al. Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nat Immunol*. 2016;17(8):976–84.
- 125.** Ma CS, Suryani S, Avery DT, Chan A, Nanan R, Santner-Nanan B, et al. Early commitment of naïve human CD4(+) T cells to the T follicular helper (TFH) cell lineage is induced by IL-12. *Immunol Cell Biol*. 2009;87(8):590–600.

- 126.** Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One*. 2011;6(3):17739.
- 127.** de Leur K, Dor FJMF, Dieterich M, van der Laan LJW, Hendriks RW, Baan CC. IL-21 Receptor Antagonist Inhibits Differentiation of B Cells toward Plasmablasts upon Alloantigen Stimulation. *Front Immunol*. 2017;8:306.
- 128.** Linterman MA, Vinuesa CG. T-follicular helper cell differentiation and the co-option of this pathway by non-helper cells. *Immunological Reviews*. 2012;247:143–59.
- 129.** Chung Y, Tanaka S, Chu F, Nurieva RI, Martinez GJ, Rawal S, et al. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*. 2011;17(8):983–8.
- 130.** Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, et al. Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*. 2011;17(8):975–82.
- 131.** Sage PT, Sharpe AH. T follicular regulatory cells in the regulation of B cell responses. *Trends Immunol*. 2015;36(7):410–8.
- 132.** Chen W, Bai J, Huang H, Bi L, Kong X, Gao Y, et al. Low proportion of follicular regulatory T cell in renal transplant patients with chronic antibody-mediated rejection. 2017;(3):1–10.
- 133.** Schmitt N, Bentebibel S, Ueno H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends Immunol*. 2014;35(9):436–42.

- 134.** Rivino L, Messi M, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F, Geginat J. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4⁺ central memory T cells. *J Exp Med*. 2004;200(6):725–35.
- 135.** Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5⁺ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758–69
- 136.** Morita R, Schmitt N, Bentebibel S, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially. 2012;34(1):108–21.
- 137.** Morita R, Schmitt N, Bentebibel S-E, Ranganathan R, Bourdery L, Zurawski G, et al. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108–21
- 138.** Chevalier N, Jarrossay D, Ho E, Avery DT, Ma CS, Yu D, et al. CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses. *J Immunol*. 2011;186(10):5556–68.
- 139.** Bentebibel S-E, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5⁺ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med* . 2013;5(176):176
- 140.** Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, Malik S, Fulcher DA, Tangye SG, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):234–44.

- 141.** He J, Tsai LM, Leong YA, Hu X, Ma CS, Chevalier N, et al. Circulating Precursor CCR7^{lo}PD-1^{hi} CXCR5⁺ CD4⁺ T Cells Indicate T_{fh} Cell Activity and Promote Antibody Responses upon Antigen Reexposure. *Immunity*. 2013;39(4):770–81.
- 142.** Badell IR, Ford ML. T follicular helper cells in the generation of alloantibody and graft rejection. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(1):1–6.
- 143.** de Graav GN, Dieterich M, Hesselink DA, Boer K, Clahsen-van Groningen MC, Kraaijeveld R, et al. Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin Exp Immunol*. 2015;180(2):329–40.
- 144.** Baan CC, de Graav GN, Boer K. T Follicular Helper Cells in Transplantation: The Target to Attenuate Antibody-Mediated Allogeneic Responses? *Curr Transplant Reports* 2014 Sep 23;1(3):166–72.
- 145.** Walters GD, Vinuesa CG. T Follicular Helper Cells in Transplantation. *Transplantation*. 2016;100(8):1650–5.
- 146.** Chenouard A, Chesneau M, Bui Nguyen L, Le Bot S, Cadoux M, Dugast E, et al. Renal Operational Tolerance Is Associated With a Defect of Blood T_{fh} Cells That Exhibit Impaired B Cell Help. *Am J Transplant*. 2017;17(6):1490–501.
- 147.** Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, et al. Monogenic mutations differentially affect the quantity and quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(4):993-1006
- 148.** Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, et al. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4⁺ T cells into distinct effector subsets. *J Exp Med*. 2016;213(8):1589–608.

- 149.** Alroqi FJ, Charbonnier L-M, Baris S, Kiykim A, Chou J, Platt CD, et al. Exaggerated follicular helper T-cell responses in patients with LRBA deficiency caused by failure of CTLA4-mediated regulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;141(3):1050-1059
- 150.** Bossaller L, Burger J, Draeger R, Grimbacher B, Knoth R, Plebani A, et al. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol.* 2006;177(7):4927–32.
- 151.** Shin B-H, Ge S, Mirocha J, Jordan SC, Toyoda M. Tocilizumab (Anti-IL-6R) Suppressed TNF α Production by Human Monocytes in an In Vitro Model of Anti-HLA Antibody-Induced Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Transplant direct.* 2017;3(3):139.
- 152.** Vo AA, Choi J, Kim I, Louie S, Cisneros K, Kahwaji J, et al. A Phase I/II Trial of the Interleukin-6 Receptor-Specific Humanized Monoclonal (Tocilizumab) + Intravenous Immunoglobulin in Difficult to Desensitize Patients. *Transplantation.* 2015;99(11):2356–63.
- 153.** Vo AA, Aubert O, Haas M, Huang E, Zhang X, Choi J, et al. Clinical Relevance of PostTransplant Donor Specific Antibodies (DSAs) in Patients Receiving Desensitization for HLA Incompatible Kidney Transplantation. 2019
- 154.** Chen J, Yin H, Xu J, Wang Q, Edelblum KL, Sciammas R, et al. Reversing endogenous alloreactive B cell GC responses with anti-CD154 or CTLA-4Ig. *Am J Transplant.* 2013 Sep;13(9):2280–92.
- 155.** Cicalese MP, Gerosa J, Baronio M, Montin D, Licciardi F, Soresina A, et al. Circulating Follicular Helper and Follicular Regulatory T Cells Are Severely Compromised in Human CD40 Deficiency: A Case Report. *Front Immunol.* 2018;9:1761.

- 156.** Shock A, Burkly L, Wakefield I, Peters C, Garber E, Ferrant J, et al. CDP7657, an anti-CD40L antibody lacking an Fc domain, inhibits CD40L-dependent immune responses without thrombotic complications: an in vivo study. *Arthritis Res. Ther.* 2015;17(1):234.
- 157.** Weber JP, Fuhrmann F, Feist RK, Lahmann A, Al Baz MS, Gentz L-J, et al. ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *J Exp Med.* 2015;212(2):217–33.
- 158.** Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Dräger R, et al. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* 2003;4(3):261–8.
- 159.** Zaitseva M, Issa F, Hester J, Vanhove B, Wood KJ. Selective blockade of CD28 on human T cells facilitates regulation of alloimmune responses. *JCI insight.* 2017;2(19):e89381.
- 160.** Badell IR, La Muraglia GM, Liu D, Wagener ME, Ding G, Ford ML. Selective CD28 Blockade Results in Superior Inhibition of Donor-Specific T Follicular Helper Cell and Antibody Responses Relative to CTLA4-Ig. *Am J Transplant.* 2018;18(1):89–101.
- 161.** Jacquemin C, Schmitt N, Contin-Bordes C, Liu Y, Narayanan P, Seneschal J, et al. OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity.* 2015;42(6):1159–70.
- 162.** Curry AJ, Chikwe J, Smith XG, Cai M, Schwarz H, Bradley JA, et al. OX40 (CD134) blockade inhibits the co-stimulatory cascade and promotes heart allograft survival. *Transplantation.* 2004;78(6):807–14.

- 163.** Wang Y-L, Li G, Fu Y-X, Wang H, Shen Z-Y. Blockade of OX40/OX40 ligand to decrease cytokine messenger RNA expression in acute renal allograft rejection in vitro. *Transplant Proc.* 2013;45(6):2565–8.
- 164.** Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, et al. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 2008;29(1):138–49.
- 165.** Avery DT, Deenick EK, Ma CS, Suryani S, Simpson N, Chew GY, et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. *J Exp Med.* 2010;207(1):155–71.
- 166.** Wong AL, Soo RA, Tan DS, Lee SC, Lim JS, Marban PC, et al. Phase I and biomarker study of OPB-51602, a novel signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 inhibitor, in patients with refractory solid malignancies. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015;26(5):998–1005.
- 167.** Wei N, Li J, Fang C, Chang J, Xirou V, Syrigos NK, et al. Targeting colon cancer with the novel STAT3 inhibitor bruceantinol. *Oncogene.* 2019;38(10):1676–87.
- 168.** Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh S. et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(39):15448–53.
- 169.** López-Oliva MO, Flores J, Madero R, Escuin F, Santana MJ, Bellón T, et al. Cytomegalovirus infection after kidney transplantation and long-term graft loss. *Nefrología.* 2017;37(5):515–25.

- 170.** Ono G, Medina Pestana JO, Aranha Camargo LF. Late cytomegalovirus (CMV) infections after kidney transplantation under the preemptive strategy: Risk factors and clinical aspects. *Transpl Infect Dis.* 2019;21(2):130-35.
- 171.** Nasr IW, Reel M, Oberbarnscheidt MH, Mounzer RH, Baddoura FK, Ruddle NH, et al. Tertiary Lymphoid Tissues Generate Effector and Memory T Cells That Lead to Allograft Rejection. *Am J Transplant.* 2007;7(5):1071–9.
- 172.** Motallebzadeh R, Rehakova S, Conlon TM, Win TS, Callaghan CJ, Goddard M, et al. Blocking lymphotoxin signaling abrogates the development of ectopic lymphoid tissue within cardiac allografts and inhibits effector antibody responses. *FASEB J.* 2012;26(1):51–62.
- 173.** Betjes MGH, Meijers RWJ, Litjens NHR. Loss of Renal Function Causes Premature Aging of the Immune System. *Blood Purif.* 2013;36(3–4):173–8.
- 174.** Betjes MG, Litjens NH. Chronic Kidney Disease and Premature Ageing of the Adaptive Immune Response. *Curr Urol Rep.* 2015;16(1):471.
- 175.** Sarnak MJ, Jaber BL. Mortality caused by sepsis in patients with end-stage renal disease compared with the general population. *Kidney Int.* 2000;58(4):1758–64.
- 176.** Betjes MGH, Langerak AW, van der Spek A, de Wit EA, Litjens NHR. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2011;80(2):208–17.
- 177.** Litjens NHR, van Druningen CJ, Betjes MGH. Progressive loss of renal function is associated with activation and depletion of naive T lymphocytes. *Clin Immunol.* 2006;118(1):83–91.


- 178.** Yoon J-W, Gollapudi S, Pahl MV, Vaziri ND. Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2006;70(2):371–6.
- 179.** Huang L, Langerak AW, Wolvers-tettero ILM, Meijers RWJ, Baan CC, Litjens NHR, et al. End stage renal disease patients have a skewed T cell receptor V β repertoire. *Immun Ageing.* 2015;1–11.
- 180.** Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, Karpinski M, Ho J, Storsley LJ, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant.* 2012 May;12(5):1157–67.
- 181.** Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan ICM. Follicular Helper T Cells. *Annu Rev Immunol.* 2016;34(1):335–68.
- 182.** Macedo C, Hadi K, Walters J, Elinoff B, Marrari M, Zeevi A, et al. Impact of Induction Therapy on Circulating T Follicular Helper Cells and Subsequent Donor-Specific Antibody Formation After Kidney Transplant. *Kidney Int reports.* 2019;4(3):455–69.
- 183.** Kasaian MT, Whitters MJ, Carter LL, Lowe LD, Jussif JM, Deng B, et al. IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity.* 2002;16(4):559–69.
- 184.** Shi J, Luo F, Shi Q, Xu X, He X, Xia Y. Increased circulating follicular helper T cells with decreased programmed death-1 in chronic renal allograft rejection. *Nephrol.* 2015;16(1):182.
- 185.** Johnston RJ, Choi YS, Diamond JA, Yang JA, Crotty S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *J Exp Med.* 2012;209(2):243–50.

- 186.** Ray JP, Staron MM, Shyer JA, Ho P-C, Marshall HD, Gray SM, et al. The Interleukin-2-mTORc1 Kinase Axis Defines the Signaling, Differentiation, and Metabolism of T Helper 1 and Follicular B Helper T Cells. *Immunity*. 2015;43(4):690–702
- 187.** Wallin EF, Hill DL, Linterman MA, Wood KJ. The Calcineurin Inhibitor Tacrolimus Specifically Suppresses Human T Follicular Helper Cells. *Front Immunol*. 2018;9:1184.
- 188.** Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13(S4):93–106.
- 189.** Dedeoglu B, Meijers RWJ, Klepper M, Hesselink DA, Baan CC, Litjens NHR, et al. Uremia-Associated Premature Aging of T Cells Does Not Predict Infectious Complications After Renal Transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16(8):2324–33.
- 190.** Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(36):14725–32.
- 191.** van Lier RAW, ten Berge IJM, Gamadia LE. Human CD8+ T-cell differentiation in response to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(12):931–9.
- 192.** Kumar D, Chernenko S, Moussa G, Cobos I, Manuel O, Preiksaitis J, et al. Cell-Mediated Immunity to Predict Cytomegalovirus Disease in High-Risk Solid Organ Transplant Recipients. *Am J Transplant*. 2009;9(5):1214–22.
- 193.** Blanco-Lobo P, Cordero E, Martín-Gandul C, Gentil MA, Suárez-Artacho G, Sobrino M, et al. Use of antibodies neutralizing epithelial cell infection to diagnose patients at risk for CMV Disease after transplantation. *J Infect*. 2016;72(5):597–607.

VIII. ANEXOS

ORIGINAL ARTICLE

Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients

Francisco Luis Cano-Romero^{1,2} | Rocío Laguna Goya^{1,2,3,4}  | Alberto Utrero-Rico^{1,2} | Elena Gómez-Massa^{1,2} | Daniel Arroyo-Sánchez^{1,2} | Patricia Suárez-Fernández^{1,2} | David Lora^{2,5} | Amado Andrés^{2,6} | M^a José Castro-Panete^{1,2} | Estela Paz-Artal^{1,2,3,4}

¹Department of Immunology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, Spain

³Department of Immunology, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

⁴Department of Pharmaceutical Sciences, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Spain

⁵CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain

⁶Department of Nephrology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

Correspondence

Rocío Laguna Goya, Department of Immunology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain
Email: rociolagunagoya@gmail.com

Funding information

Sociedad Madrileña de Trasplantes, Grant/Award Number: PI17/082; FIS-Instituto de Salud Carlos III, Grant/Award Number: PIE13/00045; ERDF (European Regional Development Fund), Grant/Award Number: PIE13/00045; Fundación José Luis Castaño

Antibody-mediated rejection is responsible for 30%-50% of renal graft failures. Differentiation of B cells into antibody-producing plasmablasts depends on the collaboration of follicular helper T cells (Tfh). We analyzed circulating Tfh (cTfh) in kidney recipients and studied cTfh relationship with anti-HLA antibody production and graft outcome. cTfh were longitudinally analyzed in a prospective cohort of patients (n = 206), pre- and posttransplantation. Clinical data, HLA sensitization, and cTfh function were recorded. Both pretransplant and 6-month posttransplant cTfh were able to derive IgG-producing plasmablasts. Pretransplant cTfh was decreased in patients, especially in those who received dialysis. However, these cells were increased in patients with previous allograft or transfusions and in HLA-sensitized recipients. After transplantation cTfh expanded, significantly more in patients who developed de novo anti-HLA antibodies than in patients who remained unsensitized. Augmented pretransplant cTfh positively correlated with higher intensity of pretransplant anti-HLA class I and with de novo anti-HLA class I and anti-HLA class II antibodies. Consistently, pretransplantation cTfh were higher in patients who experienced acute rejection (HR = 1.14 [1.04-1.25]). Thus, we show a role for Tfh in anti-HLA sensitization and rejection. Multicenter studies with additional patient cohorts are needed to validate these results. Immunosuppressive drugs targeting Tfh could be useful to improve outcomes.

KEYWORDS

kidney transplantation, HLA sensitization, circulating Tfh, acute rejection

1 | INTRODUCTION

The relevance of humoral alloreactivity in renal graft failure is currently well established. Immune rejection plays an important role in

most graft failures, and this outcome is more likely after antibody-mediated rejection (ABMR) than after T cell mediated rejection. ABMR is responsible for 30%-50% of renal graft failures.¹

Anti-HLA antibodies have been shown to correlate with worse graft outcome, especially if they are donor-specific antibodies (DSA). ABMR is more frequent, and more rapid, in patients with DSA pretransplantation.² Patients with DSA also have increased rates of chronic graft dysfunction, graft loss, and death.³ Preexistent as well as de novo DSA are associated with worse renal graft outcome.^{4,5}

Abbreviations: ABMR, antibody-mediated rejection; BPAR, biopsy-proven acute rejection; cTfh, circulating follicular helper T cell; DSA, donor-specific antibodies; ESRD, end-stage renal disease; HLA, human leukocyte antigen; IgG, Immunoglobulin G; MoAbs, monoclonal antibodies; Tfh, follicular helper T cell.

Francisco Luis Cano-Romero and Rocío Laguna Goya contributed equally to this work.

Follicular helper T cells (Tfh) are specialized in assisting B cell differentiation into plasma cells and are required for the efficient production of antibodies.^{6,7} Peripheral CD4+CXCR5+ T cells are considered cTfh and counterparts of the Tfh found in the germinal centers of secondary lymphoid organs.⁸ In the study by He et al, circulating CD4+CXCR5+PD1hiCCR7lo T cells represented active Tfh differentiation in lymphoid organs and correlated with the production of protective antibodies after infection and vaccination and with the production of pathogenic antibodies in autoimmune diseases.⁹ cTfh have been found to promote humoral responses in healthy volunteers and HIV+ patients receiving the flu vaccine.⁹⁻¹¹ cTfh levels were also increased in HIV+ patients who produced high titers of anti-HIV neutralizing antibodies¹² and in lupus patients, in particular those with greater disease severity and higher titers of ANA and anti-dsDNA autoantibodies.^{13,14}

Given the essential role of Tfh in mounting the humoral response, it is plausible to speculate that, in the context of transplantation, Tfh direct the B cell-dependent alloreactivity for the production of anti-HLA antibodies and may be associated with ABMR and graft loss. In limited series of recipients, increased cTfh were observed before the development of de novo DSA,¹⁵ in association with chronic rejection,¹⁶ or after transplantation in DSA-positive patients.¹⁷ In an in vitro alloantigen setting, plasmablast differentiation and immunoglobulin production were both dependent on IL-21-producing cTfh.¹⁸ Nevertheless, the relationship between cTfh and anti-HLA sensitization has not been clearly established and there are no published data analyzing the association between cTfh and acute graft rejection. The detection of changes in cTfh preceding anti-HLA antibody formation and rejection would highlight the potential utility of cTfh as a biomarker in transplantation. Similarly, confirming the role of cTfh in HLA sensitization and rejection would single them out as a therapeutic target to prevent ABMR and improve transplantation outcome.

Here we observed that cTfh from end-stage renal disease (ESRD) and transplanted patients were capable of transforming B cells into immunoglobulin-producing plasmablasts. cTfh were augmented in recipients with past contact with alloantigens, and a progressive expansion of the cTfh pool was observed after transplantation. The increase in cTfh was significantly higher among pretransplant sensitized patients and in transplanted patients who developed de novo anti-HLA antibodies and a correlation existed between cTfh counts and the amount of anti-HLA antibodies. Taken together, our findings provide evidence of the role of Tfh in the production of anti-HLA alloantibodies in renal transplant recipients. Consistently, higher pretransplant cTfh counts emerged as a risk factor for acute rejection.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study population

We included all renal transplant recipients between November 2014 and June 2016 at Hospital 12 de Octubre (N = 206). This cohort was

prospectively followed for one year posttransplantation, and clinical and immunological data were collected. Only for-cause biopsies for suspected rejection were performed. Rejections were defined as biopsy-proven acute rejection (BPAR) according to the 2015 Banff classification.¹⁹ All patients signed a written informed consent. The study (PIE13/00045) was approved by the institutional medical ethical committee.

2.2 | Flow cytometry

cTfh were prospectively measured on fresh peripheral blood mononuclear cells at pretransplantation and at day 7, day 14, and months 1, 3, and 6 posttransplantation. Peripheral blood mononuclear cells were stained with the following monoclonal antibodies (MoAbs): CD4 FITC (BD), CXCR5 APC (BD), PD1 PE (eBioscience, San Diego, CA), and CCR7 PerCP-Cy5.5 (BD). Cells were acquired using a BD Canto II flow cytometer and results were analyzed with Flow Jo V10 software. We defined cTfh as CD4+CXCR5+ or CD4+CXCR5+PD1hiCCR7lo^{8,9} (Figure 1A). Absolute numbers were calculated using the lymphocyte count from a hemogram on the same day and the percentage of cTfh obtained in our analysis.

2.3 | cTfh and memory B cell coculture

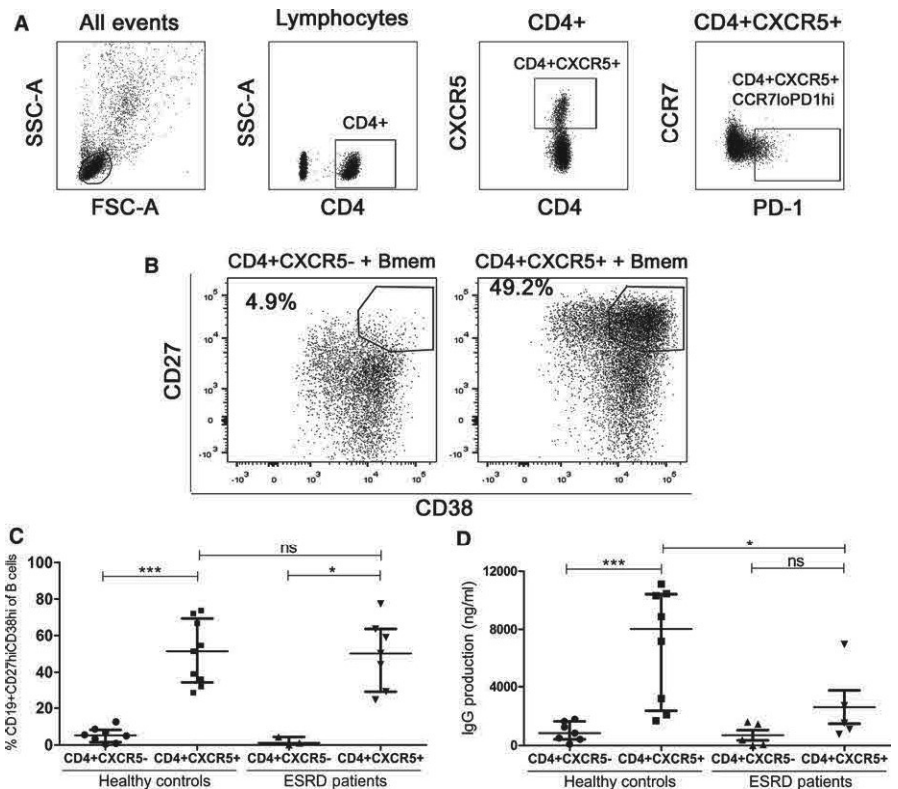
cTfh (CD3+CD4+CXCR5+), non-cTfh (CD3+CD4+CXCR5-), and memory B cells (CD19+CD27+) were isolated using a BD Influx™ sorter. Isolated cTfh and enriched memory B cells were cocultured 1:1 for 7 days, in the presence of the superantigen *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB; 1ug/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Differentiation of memory B cells into plasmablasts (defined as CD19+CD27hiCD38hi) was measured by flow cytometry and analyzed using Flow Jo V10 software. The following MoAbs were used: CD3 PE-Cy7, CD4 FITC, CXCR5 APC, CD19 PE, CD27 APC-H7, and CD38 FITC (BD). Dead cells were excluded using DAPI (Sigma). Immunoglobulin G (IgG) was measured in the collected supernatants by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay.

2.4 | Detection of anti-HLA antibodies

Anti-HLA antibody screening was performed in all patients pre- and posttransplantation in fresh serum samples by multiplex microsphere-based flow cytometry (Luminex Technology, LABScreen Mixed® kit, One Lambda, CA). The fluorescent signal for each coated bead was measured using LABScan 100 Flow Cytometry and analyzed by HLA-Fusion software (One Lambda). The test was considered positive when the standard fluorescence intensity (SFI) was above 40 000 for anti-HLA class I and class II beads. Anti-HLA antibodies developing after transplantation were considered de novo anti-HLA antibodies.

2.5 | Statistical analysis

Demographic and clinical characteristics of patients were described for the complete series with median and 10-90 percentile range, or absolute and relative frequencies. cTfh were stratified for patients'



characteristics (dialysis, number of renal transplant, transfusions, and anti-HLA antibodies) and their distributions compared with a Mann-Whitney U test. The correlation between two variables was analyzed by Spearman test and graphically represented by scatter plot and regression line. Changes in cTfh over time were evaluated with mixed-effects regression models for continuous outcomes. These models allowed for the quantification of the extra variability in the response variables and for the inclusion of samples with incomplete data across time. To analyze the association between cTfh and acute rejection, the number of days from transplantation to rejection was taken into account. Cox regression was used to estimate the impact of pretransplant cTfh on rejection, and hazard ratio was calculated with 95% confidence interval. Statistical analysis was performed using Stata 13.0 and SAS 9.3. $P < .05$ was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Characteristics of the recipient cohort

Table 1 shows the main characteristics of the studied cohort. The median age was 56 and most patients were male, on dialysis, and receiving their first transplant from brain-dead donors. Patients with intermediate and high immunological risk received induction therapy with basiliximab (40% of recipients) and thymoglobulin (45%), respectively. After transplantation, all patients received tacrolimus, mycophenolate mofetil, and glucocorticoids as immunosuppressive maintenance therapy. Eighteen patients (8.7%) had a BPAR within the one-year posttransplantation follow-up.

3.2 | Circulating CD4+CXCR5⁺ T cells differentiate B cells into IgG-producing plasmablasts

We first tested whether the peripheral blood CD4+CXCR5⁺ T cells we recorded were able to differentiate B cells into immunoglobulin-producing plasmablasts and could then be considered as true Tfh representatives. We cocultured CD4+CXCR5⁺ and CD4+CXCR5⁻ T cells from healthy controls with memory-enriched B cells and quantified the formation of plasmablasts. The transformation of B cells into plasmablasts was significantly higher in cultures with CD4+CXCR5⁺ than in those with CD4+CXCR5⁻ T cells (Figure 1B,C). Consistently, the amount of IgG was superior in supernatants from B cells and CD4+CXCR5⁺ T cell cocultures (Figure 1D). We therefore showed that the circulating CD4+CXCR5⁺ cells we measured in peripheral blood are functionally similar to Tfh cells, and can be referred to as cTfh. Circulating plasmablasts were barely detectable in peripheral blood from healthy controls (data not shown).

3.3 | cTfh are reduced in ESRD subjects and in patients receiving dialysis

The proportion of cTfh was significantly decreased in ESRD patients when compared to healthy controls (5.1% vs 8.1%, $P = .002$) (Figure 2A). Among ESRD subjects, lower cTfh proportion and lower absolute numbers were observed in patients on dialysis when compared to patients who were not yet receiving replacement therapy (4.8% vs 8.2%, $P = .012$, and 81.8 cel/uL vs 152.9 cel/uL, $P = .005$, respectively) (Figure 2B,C). Moreover, time in dialysis

TABLE 1 Patient and donor characteristics and transplantation outcome

Study population	(n = 206)
Recipient age in y (median, range)	56 (16-83)
Recipient gender (male)	145 (70.4%)
Cause of end-stage renal disease	
Diabetic nephropathy	37 (18%)
Polycystic kidney disease	26 (12.6%)
Hypertensive nephrosclerosis	17 (8.3%)
IgA nephropathy	18 (8.7%)
Focal segmental glomerulonephritis	13 (6.3%)
Membranoproliferative glomerulonephritis	4 (1.9%)
Other glomerulonephritis	15 (7.3%)
Tubulointerstitial nephropathy	10 (4.9%)
Reflux nephropathy	8 (3.9%)
Vasculitis	4 (1.9%)
Amyloidosis	3 (1.5%)
Miscellaneous	52 (24.8%)
Previous kidney transplantation	
Second kidney transplantation	21 (10.2%)
Third kidney transplantation	4 (1.9%)
Fourth kidney transplantation	4 (1.9%)
Renal replacement therapy before transplantation	
Hemodialysis	155 (76%)
Peritoneal dialysis	32 (15.7%)
No dialysis	17 (8.3%)
NR	2 (1%)
Pretransplantation anti-HLA antibodies	
No	167 (81%)
Yes	39 (19%)
Donor age in y (median, range)	54 (17-83)
Transplant source	
Brain death donor	126 (61.2%)
Cardiac death donor	53 (25.7%)
Living donor	27 (13.1%)
Induction therapy	
Thymoglobulin	93 (45.1%)
Basiliximab	83 (40.3%)
Rituximab	3 (1.5%)
No induction	23 (11.2%)
NR	4 (1.9%)
Rejection within 12 mo of transplantation	
No	188 (91.3%)
Yes	18 (8.7%)
Delayed graft function (^a)	108 (52.7%)

NR, not recorded.

^aDialysis requirement in first two postoperative weeks.

seemed to correlate with a gradual diminishing of CD4+CXCR5+ (Figure 2D and Figure S1A) and CD4+CXCR5+CCR7loPD1hi cell numbers (Figure S1B). Although fewer cTfh were observed in ESRD patients, these cells maintained a capacity to differentiate B cells into plasmablasts similar to controls (Figure 1C). However, plasmablasts from ESRD patients produced less IgG than those from controls.

3.4 | Effect of induction therapy on cTfh

During the posttransplantation follow-up, cTfh increased in the overall group of patients. When we analyzed the cohort according to the induction therapy received, we observed that the profile of cTfh posttransplantation in basiliximab-treated patients was very similar to that of patients without induction therapy (Figure 2E). In particular, the cTfh count at month 6 posttransplant was double the pretransplantation cTfh count in both basiliximab-treated (9.4 cel/uL vs 4.2 cel/uL, $P < .001$) and no-induction patients (11.6 cel/uL vs 6.6 cel/uL, $P = .018$). On the contrary, in thymoglobulin-treated patients there was a striking reduction in cTfh numbers soon after the administration of the induction therapy (3.35 cel/uL pretransplantation vs 0.03 cel/uL at day 7, $P < .001$). cTfh numbers in thymoglobulin-treated patients also increased over time posttransplant but remained lower than in the basiliximab and no-induction groups at every time point. At month 6, the cTfh numbers in the thymoglobulin-treated group were similar to pretransplantation (3.5 vs 3.35 cel/uL, $P = .59$). Thus, thymoglobulin drastically eliminated cTfh, taking 6 months for these cells to recover, whereas basiliximab had no depleting effect on cTfh.

3.5 | cTfh are increased pretransplantation in recipients with previous exposure to alloantigens and in HLA-sensitized recipients

We analyzed the relationship between cTfh and previous exposure to alloantigens in patients in the waiting list. In our cohort, 10.2% of patients received a second renal allograft. This group of patients who had received a previous renal transplant (and had therefore been exposed to alloantigens from the previous donor) showed a higher pretransplantation cTfh frequency than the recipients of a first allograft (1.7% vs 0.8%, $P = .025$) (Figure 3A). Second kidney recipients also had higher pretransplantation cTfh absolute numbers, although not significantly different than first transplant patients (Figure 3B). Patients who had had blood transfusions (39.3% in our cohort) showed increased cTfh compared to nontransfused recipients (1% vs 0.7%, $P = .018$) (Figure 3C). Women with a previous pregnancy did not show higher Tfh counts (data not shown).

Thus, in our cohort, patients who received transfusions or a previous kidney graft showed augmented cTfh. Exposure to alloantigens drives the production of anti-HLA antibodies, so we asked

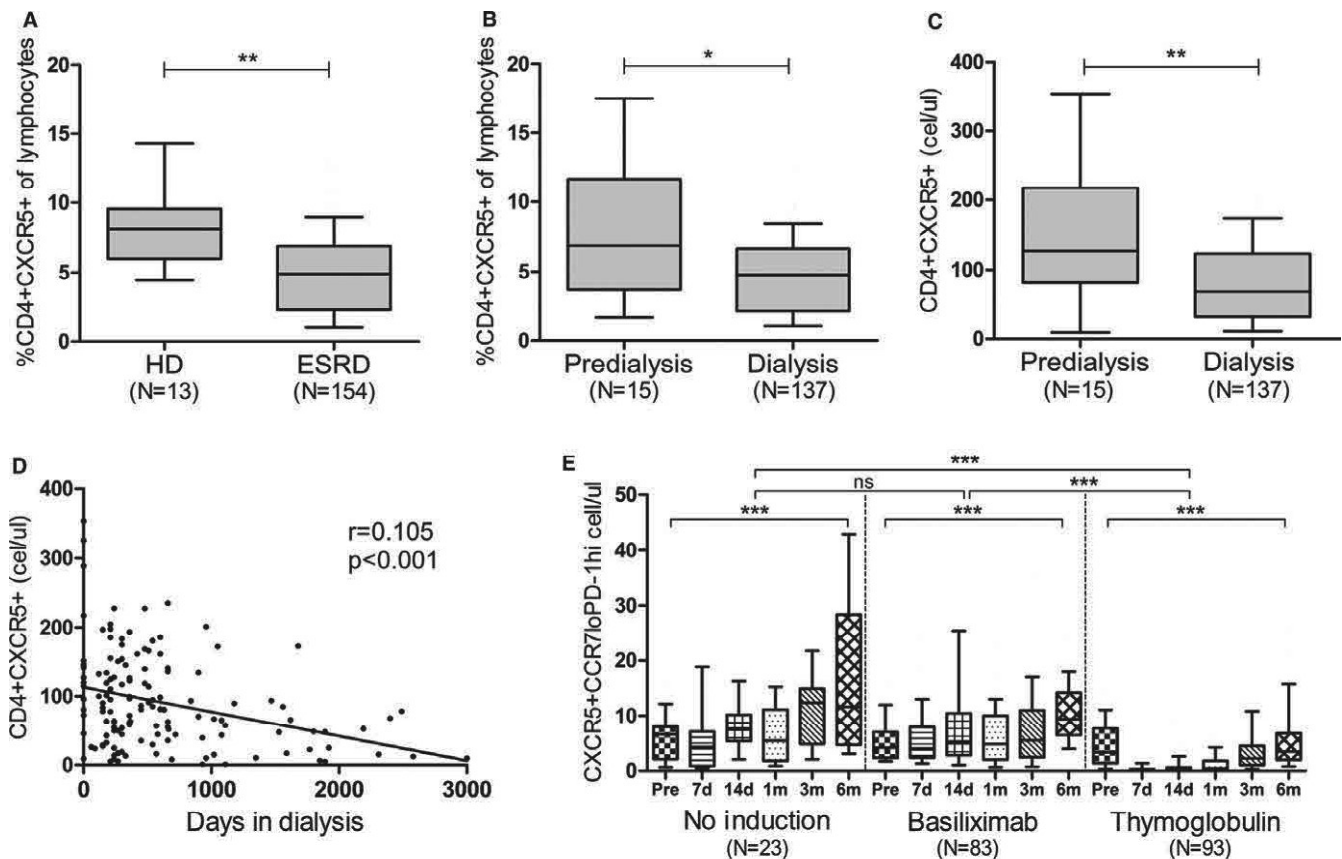


FIGURE 2 Low cTfh in ESRD and dialysis patients and effect of induction therapy. (A) cTfh were lower in patients with ESRD vs healthy controls (HC) ($P = .002$). (B) Patients who received dialysis as replacement therapy had decreased cTfh proportion ($P = .012$) and (C) decreased cTfh absolute numbers ($P = .005$) when compared to patients in predialysis. (D) Inverse correlation between cTfh absolute numbers and time in dialysis ($P < .001$). (E) cTfh augmented within the first 6 months after transplantation; however, patients who received thymoglobulin had significantly lower numbers of cTfh than basiliximab-treated patients or patients without induction. There were barely no cTfh at +7 and +14 days posttransplantation in the thymoglobulin-treated group. cTfh in basiliximab-treated patients did not differ from those receiving no induction. * $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$

whether, before transplantation, higher numbers of cTfh could be related to anti-HLA sensitization. cTfh were increased pretransplantation in patients with anti-HLA class I antibodies vs nonsensitized patients, although this comparison did not reach statistical significance (1.2% vs 0.8%, $P = .1$). Because women have lower cTfh than men (Figure S2), and there was a higher proportion of women within the sensitized group (51.2% vs 24.5% in the nonsensitized group), we analyzed the association between pretransplant cTfh and anti-HLA sensitization separately in men and women. We found higher cTfh numbers in women with anti-HLA class I antibodies than in nonsensitized women (9.2 cel/uL vs 3.5 cel/uL, $P = .23$) (Figure 3D), and this difference reached significance when comparing cTfh frequencies between those groups (1.7% vs 0.8%, $P = .026$) (Figure 3E). We did not find this association between cTfh and anti-HLA class II antibodies (Figure S3A,B). Moreover, a positive correlation was found between frequencies of cTfh and levels of anti-HLA class I antibodies (Figure 3F). These data suggest a role of Tfh for the production of anti-HLA antibodies in patients with contact to alloantigens before transplantation.

3.6 | cTfh are associated with de novo anti-HLA antibody production in renal transplanted patients

We studied cTfh numbers in patients who were not anti-HLA sensitized pretransplantation. Unsensitized recipients were divided depending on whether they developed de novo anti-HLA antibodies during the one-year clinical follow-up (-/+ group, 7%) or not (-/- group, 93%). As already noted, cTfh increased with time posttransplant in both groups ($P < .001$); however, patients who developed de novo anti-HLA antibodies showed a significantly higher expansion of cTfh than recipients remaining anti-HLA-negative ($P < .05$) (Figure 4A,B). This result was not due to differences in induction treatment between the groups, because the proportion of patients with no induction, basiliximab, or thymoglobulin was similar in -/+ or -/- patients ($P = .13$). Interestingly, we observed a positive correlation between cTfh frequencies pretransplantation and the intensity of de novo anti-HLA class I and II antibodies (Figure 4C,D). No association was found between cTfh frequencies pretransplantation and de novo DSA (Figure S3C,D).

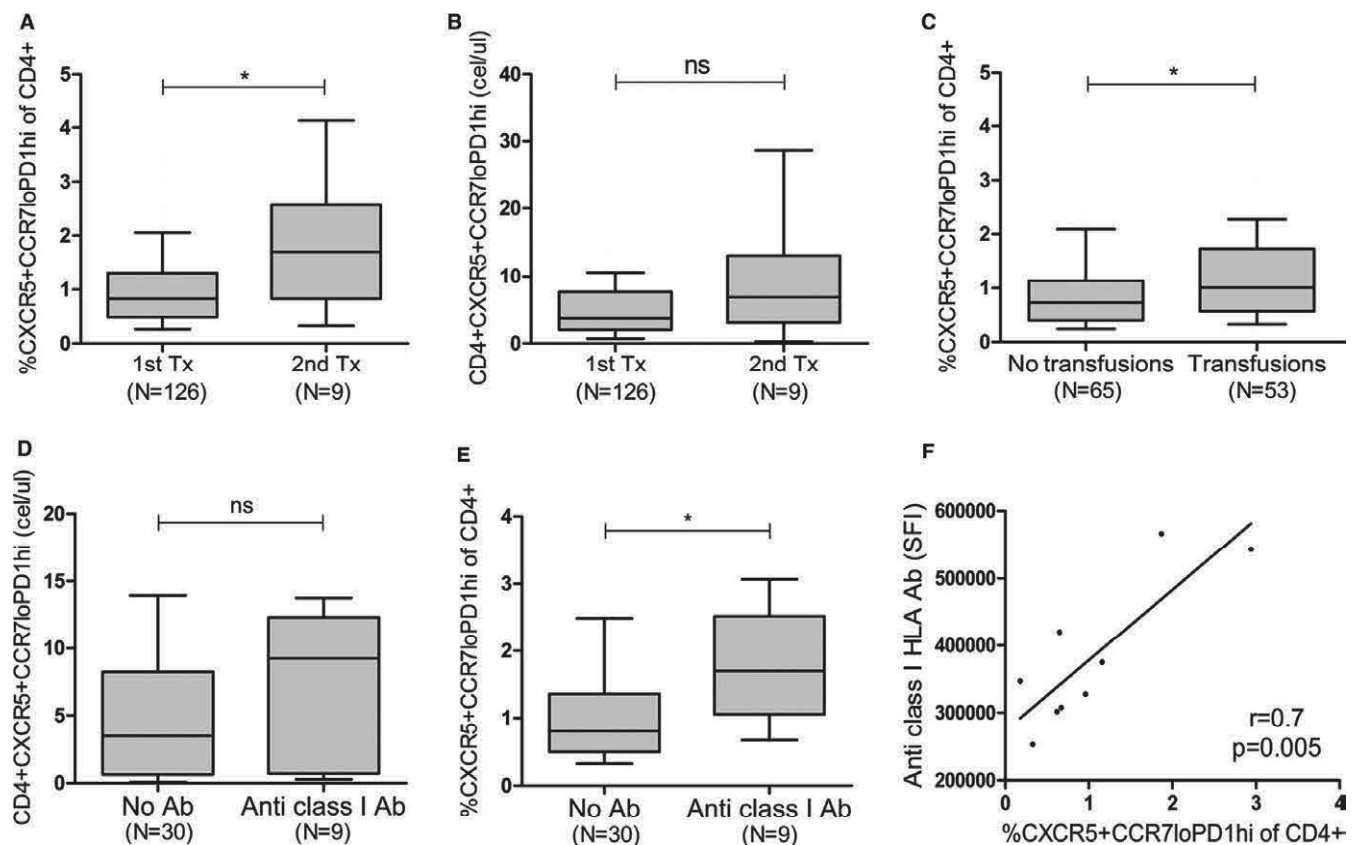


FIGURE 3 Patients exposed to alloantigens had increased cTfh pretransplantation and augmentation of cTfh correlated with anti-HLA class I antibody intensity. (A) Patients who received a second renal transplant had higher frequency of cTfh pretransplantation than patients receiving their first renal transplant ($P = .025$). (B) There was also a trend toward increased cTfh numbers in retransplantation patients. (C) Patients who had had previous blood transfusions also showed increased pretransplant cTfh ($P = .018$). (D) There was a trend toward higher absolute numbers of cTfh in female patients who had pretransplant anti-HLA class I antibodies compared to nonsensitized female patients. (E) Sensitized women had higher frequency of pretransplant cTfh than nonsensitized women ($P = .026$). (F) There was a positive correlation between cTfh and anti-HLA class I antibody levels within the group of highly HLA-sensitized patients ($P = .005$). * $P < .05$

The development of de novo anti-HLA antibodies posttransplantation suggests cTfh activity despite maintenance immunosuppression. We tested the capacity of cTfh from transplanted patients to differentiate B cells into plasmablasts in vitro. Circulating CD4+CXCR5+ obtained from patients 6 months after transplantation were able to derive IgG-producing plasmablasts. However, cultures from patients produced less IgG than those from healthy controls ($P = .021$) (Figure 4E,F and Figure S4). This reduced function of patients' cTfh could be because of the immunosuppressive maintenance therapy patients received.

3.7 | Higher cTfh are associated with acute rejection in renal transplantation

Because we found a relationship between higher cTfh and pretransplantation or de novo anti-HLA sensitization, and because anti-HLA antibodies enhance the risk for rejection, we assessed the association between cTfh and acute rejection. In our cohort, 18 patients (8.7%) experienced BPAR. Pretransplantation count of cTfh was positively associated with BPAR risk (HR = 1.14 (1.04-1.25), $P < .01$). Thus, BPAR was 1.14 times more likely to

occur per each increase of 1 cTfh per microliter as measured before transplantation.

4 | DISCUSSION

Tfh have been extensively studied in the fields of autoimmunity, vaccines, and infection, where they have been shown to be crucial for the production of either aberrant or protective antibodies.⁹⁻¹⁴ However, little is known about the role of Tfh in humoral alloimmunity. With the discovery of circulating Tfh,⁸ the analysis of Tfh properties in humans has become more accessible. In the present paper we have confirmed, as others before,^{13,17,18} that circulating CD4+CXCR5+ include cells functionally similar to Tfh in secondary lymphoid organs, in that they direct the differentiation of B cells into plasmablasts able to secrete immunoglobulins. This was not the case when we cocultured non-cTfh (CD4+CXCR5-) with memory B cells.

We found cTfh were decreased in ESRD patients compared to healthy controls. Commonly, patients waiting for a renal transplant suffer uremia-associated immunodeficiency with lymphopenia and impaired immune function of T cells and other immune cells.²⁰ Our

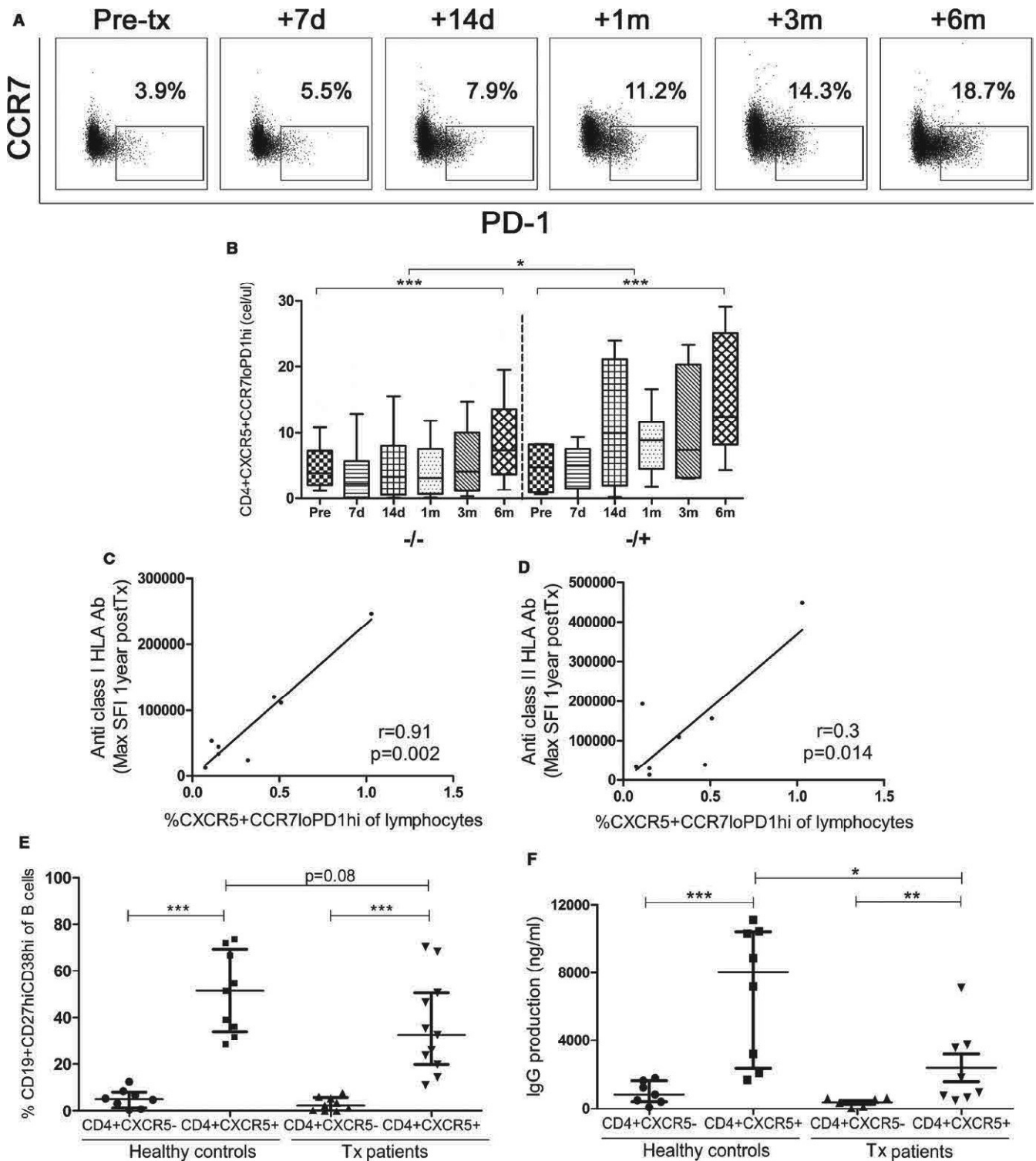


FIGURE 4 cTfh correlated with de novo HLA-sensitization posttransplantation. (A) Representative example of the increase of cTfh (CD4+CXCR5+PD1hiCCR7lo) frequency posttransplantation in a de novo HLA-sensitized patient. (B) The increase in cTfh posttransplantation was significantly higher in patients who developed de novo anti-HLA antibodies (-/+) during the 1-year clinical follow-up compared to patients who did not develop antibodies (-/-) ($P < .05$). (C-D) Higher pretransplantation cTfh frequencies positively correlated with higher levels of anti-HLA class I and class II posttransplantation. (E-F) cTfh from patients 6 months posttransplantation maintained their capacity to differentiate IgG-producing plasmablasts, although it was lower than in controls. * $P < .05$; *** $P < .001$

patients had low lymphocyte count (data not shown), which could explain the reduction in absolute numbers of cTfh. However, they also had a reduction in the proportion of cTfh, which means that the

cTfh subpopulation is more acutely reduced than other cell subsets within the lymphocyte compartment. This finding suggests that the proinflammatory environment and oxidative stress associated with

uremia²¹ affect preferentially CD4+CXCR5+ T cells. On the other hand, the small proportion of ESRD patients not yet receiving renal replacement therapy (predialysis) showed a cTfh frequency similar to healthy controls. This raises the possibility that the dialysis process itself may be selectively depleting cTfh. In fact, we found that the decrease in cTfh positively correlated with time in dialysis. In our hands, cTfh from patients on dialysis maintained the capacity to differentiate B cells into plasmablasts, although their IgG production was reduced, suggesting that uremia partially affects cTfh function.

The observed gradual increase of cTfh during the 6 months after transplantation could reflect recovery from uremia, because of the new functional kidney, or recovery from the potential depletion effect of dialysis. Remarkably, cTfh numbers increased in the presence of the usual immunosuppressive maintenance therapy. We observed that, although to a lesser extent than control cTfh, patient cTfh at 6 months posttransplant were able to differentiate immunoglobulin-producing plasmablasts, despite being exposed to immunosuppressive therapy. Whether this difference is significant or not remains to be further investigated.

Regarding induction therapy, we found that thymoglobulin drastically reduced cTfh count in the early posttransplantation period and it took 6 months for cTfh cells to recover to pretransplantation level. On the contrary, basiliximab, a nondepleting antibody that blocks IL2 receptor, had no reducing effect on cTfh count. Moreover, basiliximab-treated patients showed an early expansion of cTfh, during the first 2 weeks after transplantation, and 6 months after transplantation, basiliximab-treated patients showed twice the cTfh number than pretransplant. Previous data support that blocking of IL-2 signaling may promote Tfh differentiation and humoral responses by abolition of Blimp-1 expression and removal of the Blimp-1 inhibitory effect on Bcl-6, the master transcription factor of Tfh cells.^{22,23} These findings may be clinically relevant because basiliximab, frequently used to reduce immunological adverse events, may not have the desired modulatory effect on Tfh cells. Because Tfh cells are probably an essential component of the deleterious humoral alloresponse for the graft, basiliximab-treated patients might be at a higher risk of humoral rejection. In accord with these data, Hellemans and coworkers have recently proposed that IL-2 receptor antagonists do not add benefit in standard-risk transplantation and are inferior to thymoglobulin for high-risk recipients.²⁴ Further studies on the effect of basiliximab on Tfh will be useful to assess its utility in avoiding humoral alloresponses against the graft.

cTfh have been found to expand after effective vaccination or after infection.^{25–27} We therefore hypothesized that previous exposure to alloantigens could increase cTfh in patients in the waiting list. Patients with past kidney transplant or blood transfusions showed higher cTfh pretransplantation. The expansion of cTfh in these patients may reflect allospecific responses not only directed against HLA but also against minor histocompatibility antigens, together with responses against environmental and pathogenic stimuli. In particular, patients with a previous transplant are commonly infected with Citomegalovirus and *Candida albicans*, and up to 10% of the T cell repertoire can be specific for these infections.^{28,29} Further studies on the T-cell receptor repertoire to analyze the composition of the expanded population would be of interest.

Previous exposure to alloantigens is considered a risk factor in transplantation through the production of anti-HLA antibodies. In our cohort, we failed to demonstrate a statistical association between cTfh and presence of anti-HLA antibodies in male recipients and in anti-HLA class II sensitized recipients, probably because of the low number of subjects in these patient groups. However, women with pretransplant anti-HLA antibodies had higher cTfh and there was a direct correlation between cTfh frequency and intensity of anti-HLA antibody production.

Based on the expansion of cTfh in chronic viral infections,^{30–32} we speculated that permanent contact with antigens from the allograft could stimulate the expansion of the cTfh pool posttransplant, which would translate into production of alloantibodies. Indeed, transplanted patients who developed de novo anti-HLA antibodies had higher cTfh numbers posttransplantation. A similar finding was published by Chenouard et al, who reported higher cTfh counts at 1-year posttransplantation in stable renal transplant patients subsequently developing de novo DSA.¹⁵ In our cohort, we did not observe an association between cTfh and DSA as the number of patients who developed de novo DSA was very low. Finally, we found that pretransplantation numbers of cTfh were associated with BPAR with a significant HR of 1.14. Thus, we show here for the first time that higher cTfh levels are a risk factor for acute rejection in renal transplantation. The interaction between cTfh and B cells resulting in plasmablast differentiation and immunoglobulin production could plausibly promote ABMR. In addition, IL-21 secreted by Tfh could upregulate the production of granzyme B in CD8 T cells thereby enhancing their cytotoxic capacity and favoring T cell mediated rejection.³³

In summary, renal transplant patients with higher cTfh are more likely to have pretransplantation anti-HLA antibodies, to develop de novo anti-HLA antibodies, and to suffer acute graft rejection. Although interesting, these results come from a single-cohort, single-center study and should be validated by analyzing additional patient subsets in multicenter studies. If confirmed, cTfh might be of use as a biomarker for the management of renal transplant patients and immunosuppressive drugs directed against cTfh could be of help to prevent humoral alloresponses and improve renal transplantation outcome.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by projects to EPA from FIS, Instituto de Salud Carlos III (Spain), cofinanced by ERDF (European Regional Development Fund) (PIE13/00045), and from Sociedad Madrileña de Trasplante (PI17/082). FLCR received a grant from the Fundación José Luis Castaño. We thank Paloma Talayero, Ana Martínez Feito, and Rebeca Pena for their technical help. We also thank all patients who contributed to the study.

DISCLOSURE

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to disclose as described by the *American Journal of Transplantation*.

ORCID

Rocio Laguna Goya  <http://orcid.org/0000-0003-4265-8567>

REFERENCES

- Sellares J, de Freitas DG, Mengel M, et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*. 2012;12(2):388-399.
- Fidler SJ, Irish AB, Lim W, Ferrari P, Witt CS, Christiansen FT. Pre-transplant donor specific anti-HLA antibody is associated with antibody-mediated rejection, progressive graft dysfunction and patient death. *Transplant Immunol*. 2013;28(4):148-153.
- Mehra NK, Siddiqui J, Baranwal A, Goswami S, Kaur G. Clinical relevance of antibody development in renal transplantation. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1283:30-42.
- Lefaucheur C, Loupy A, Hill GS, et al. Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1398-1406.
- Wiebe C, Gibson IW, Blydt-Hansen TD, et al. Evolution and clinical pathologic correlations of de novo donor-specific HLA antibody post kidney transplant. *Am J Transplant*. 2012;12(5):1157-1167.
- Vinuesa CG, Linterman MA, Yu D, MacLennan IC. Follicular helper T cells. *Ann Rev Immunol*. 2016;34:335-368.
- Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-542.
- Morita R, Schmitt N, Bentebibel SE, et al. Human blood CXCR8(+) CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*. 2011;34(1):108-121.
- He J, Tsai LM, Leong YA, et al. Circulating precursor CCR9(lo) PD-1(hi) CXCR9(+) CD4(+) T cells indicate Tfh cell activity and promote antibody responses upon antigen reexposure. *Immunity*. 2013;39(4):770-781.
- Pallikkuth S, Pilakka Kanthikeel S, Silva SY, Fischl M, Pahwa R, Pahwa S. Upregulation of IL-21 receptor on B cells and IL-21 secretion distinguishes novel 2009 H1N1 vaccine responders from nonresponders among HIV-infected persons on combination antiretroviral therapy. *J Immunol*. 2011;186(11):6173-6181.
- Pallikkuth S, Parmigiani A, Silva SY, et al. Impaired peripheral blood T-follicular helper cell function in HIV-infected nonresponders to the 2009 H1N1/09 vaccine. *Blood*. 2012;120(5):985-993.
- Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, et al. Human circulating PD-1+CXCR12-CXCR12+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity*. 2013;39(4):758-769.
- Zhang X, Lindwall E, Gauthier C, et al. Circulating CXCR13+CD4+helper T cells in systemic lupus erythematosus patients share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production. *Lupus*. 2015;24(9):909-917.
- Simpson N, Gatenby PA, Wilson A, et al. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):234-244.
- Chenouard A, Chesneau M, Bui Nguyen L, et al. Renal operational tolerance is associated with a defect of blood Tfh cells that exhibit impaired B cell help. *Am J Transplant*. 2017;17(6):1490-1501.
- Shi J, Luo F, Shi Q, Xu X, He X, Xia Y. Increased circulating follicular helper T cells with decreased programmed death-1 in chronic renal allograft rejection. *BMC Nephrol*. 2015;16:182.
- de Graaf GN, Dieterich M, Hesselink DA, et al. Follicular T helper cells and humoral reactivity in kidney transplant patients. *Clin Exp Immunol*. 2015;180(2):329-340.
- de Leur K, Dor FJ, Dieterich M, van der Laan LJ, Hendriks RW, Baan CC. IL-21 receptor antagonist inhibits differentiation of B cells toward plasmablasts upon alloantigen stimulation. *Front Immunol*. 2017;8:306.
- Loupy A, Haas M, Solez K, et al. The Banff 2015 kidney meeting report: current challenges in rejection classification and prospects for adopting molecular pathology. *Am J Transplant*. 2017;17(1):28-41.
- Betjes MG, Langerak AW, van der Spek A, de Wit EA, Litjens NH. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2011;80(2):208-217.
- Betjes MG, Litjens NH. Chronic kidney disease and premature ageing of the adaptive immune response. *Curr Urol Rep*. 2015;16(1):471.
- Yan L, de Leur K, Hendriks RW, et al. T follicular helper cells as a new target for immunosuppressive therapies. *Front Immunol*. 2017;8:1510.
- Ray JP, Staron MM, Shyer JA, et al. The interleukin-2-mTORc1 kinase axis defines the signaling, differentiation, and metabolism of T helper 1 and follicular B helper T cells. *Immunity*. 2015;43(4):690-702.
- Hellems R, Bosmans JL, Abramowicz D. Induction therapy for kidney transplant recipients: do we still need anti-IL2 receptor monoclonal antibodies? *Am J Transplant*. 2017;17(1):22-27.
- Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):412-426.
- Wu J, Cui D, Yang X, et al. Increased frequency of circulating follicular helper T cells in children with hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus 71 infection. *J Immunol Res*. 2014;2014:651872.
- Zhang Y, Wang Y, Jiang Y, et al. T follicular helper cells in patients with acute schistosomiasis. *Parasites Vectors*. 2016;9(1):321.
- Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *N Engl J Med*. 2007;357(25):2601-2614.
- Kaminski H, Fishman JA. The cell biology of cytomegalovirus: implications for transplantation. *Am J Transplant*. 2016;16(8):2254-2269.
- Vella LA, Herati RS, Wherry EJ. CD4(+) T cell differentiation in chronic viral infections: the Tfh perspective. *Trends Mol Med*. 2017;23(12):1072-1087.
- Cook KD, Shpargel KB, Starmer J, et al. T follicular helper cell-dependent clearance of a persistent virus infection requires T cell expression of the histone demethylase UTX. *Immunity*. 2015;43(4):703-714.
- Comarmond C, Garrido M, Pol S, et al. Antiviral therapy restores immune tolerance to patients with hepatitis C virus-induced cryoglobulinemia vasculitis. *Gastroenterology*. 2017;152(8):pp. 2052-2062 e2052.
- de Leur K, Claassen-van Groningen MC, van den Bosch T, et al. Characterization of ectopic lymphoid structures in different types of acute renal allograft rejection. *Clinical Exp Immunol*. 2018;192(2):224-232.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Cano-Romero FL, Laguna Goya R, Utrero-Rico A, et al. Longitudinal profile of circulating T follicular helper lymphocytes parallels anti-HLA sensitization in renal transplant recipients. *Am J Transplant*. 2018;00:1-9. <https://doi.org/10.1111/ajt.14987>